

# Über eine neue gerinnbare Begleitkomponente des Fibrinogens

Wolfgang Jilg

1973







Aus dem Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung, München

Abteilung Prof. Dr. K. Kühn

Über eine neue  
gerinnbare Begleitkomponente  
des Fibrinogens

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät

der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Wolfgang Jilg

aus

Neuburg a. d. Donau

1973

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. H. Hörmann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. R. Marx

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 20. 11. 1973



Herrn Priv. Doz. Dr. Helmut Hörmann danke ich herzlich für die Anregung des Themas und seine wissenschaftliche Anleitung sowie für zahlreiche wertvolle Ratschläge und Gespräche.

Herrn Prof. Dr. Rudolf Marx danke ich sehr für die Vertretung dieser Arbeit vor der Fakultät.



# INHALTSVERZEICHNIS

|                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------|----|
| I. Vorwort                                                                 | 1  |
| II. Die Bedeutung der Kulturgeschichte für die Gegenwart                   | 2  |
| 1. Die Kulturgeschichte als Hilfswissenschaft der Geschichtswissenschaft   | 3  |
| 2. Die Kulturgeschichte als Wissenschaft                                   | 4  |
| 3. Die Kulturgeschichte als Lebenswissenschaft                             | 5  |
| III. Die Kulturgeschichte als Hilfswissenschaft der Geschichtswissenschaft | 6  |
| 1. Die Kulturgeschichte als Hilfswissenschaft der Geschichtswissenschaft   | 7  |
| 2. Die Kulturgeschichte als Hilfswissenschaft der Geschichtswissenschaft   | 8  |
| 3. Die Kulturgeschichte als Hilfswissenschaft der Geschichtswissenschaft   | 9  |
| IV. Die Kulturgeschichte als Wissenschaft                                  | 10 |
| 1. Die Kulturgeschichte als Wissenschaft                                   | 11 |
| 2. Die Kulturgeschichte als Wissenschaft                                   | 12 |
| 3. Die Kulturgeschichte als Wissenschaft                                   | 13 |
| V. Die Kulturgeschichte als Lebenswissenschaft                             | 14 |
| 1. Die Kulturgeschichte als Lebenswissenschaft                             | 15 |
| 2. Die Kulturgeschichte als Lebenswissenschaft                             | 16 |
| 3. Die Kulturgeschichte als Lebenswissenschaft                             | 17 |
| VI. Die Kulturgeschichte als Hilfswissenschaft der Geschichtswissenschaft  | 18 |
| 1. Die Kulturgeschichte als Hilfswissenschaft der Geschichtswissenschaft   | 19 |
| 2. Die Kulturgeschichte als Hilfswissenschaft der Geschichtswissenschaft   | 20 |
| 3. Die Kulturgeschichte als Hilfswissenschaft der Geschichtswissenschaft   | 21 |
| VII. Die Kulturgeschichte als Wissenschaft                                 | 22 |
| 1. Die Kulturgeschichte als Wissenschaft                                   | 23 |
| 2. Die Kulturgeschichte als Wissenschaft                                   | 24 |
| 3. Die Kulturgeschichte als Wissenschaft                                   | 25 |
| VIII. Die Kulturgeschichte als Lebenswissenschaft                          | 26 |
| 1. Die Kulturgeschichte als Lebenswissenschaft                             | 27 |
| 2. Die Kulturgeschichte als Lebenswissenschaft                             | 28 |
| 3. Die Kulturgeschichte als Lebenswissenschaft                             | 29 |
| IX. Die Kulturgeschichte als Hilfswissenschaft der Geschichtswissenschaft  | 30 |
| 1. Die Kulturgeschichte als Hilfswissenschaft der Geschichtswissenschaft   | 31 |
| 2. Die Kulturgeschichte als Hilfswissenschaft der Geschichtswissenschaft   | 32 |
| 3. Die Kulturgeschichte als Hilfswissenschaft der Geschichtswissenschaft   | 33 |



## INHALTSVERZEICHNIS

|                                                                                                         |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| A. Einleitung                                                                                           | 1  |
| I. Chemische und biologische Eigenschaften des Fibrinogens                                              | 1  |
| 1. Vorkommen, chemische und physikochemische Daten                                                      | 1  |
| 2. Der Gerinnungsvorgang                                                                                | 3  |
| 3. Fibrinolyse                                                                                          | 8  |
| II. Isolierung von Fibrinogen                                                                           | 8  |
| III. Heterogenität des Fibrinogens                                                                      | 10 |
| B. Themenstellung                                                                                       | 15 |
| C. Experimenteller Teil                                                                                 | 16 |
| I. Gewinnung des Plasmas aus Rinderblut                                                                 | 16 |
| II. Fällungsverfahren                                                                                   | 16 |
| III. Bestimmung des Fibrinogengehalts und der Gerinnbarkeit                                             | 18 |
| 1. Photometrische Bestimmung nach Überführung des Fibrinogens in Fibrin                                 | 18 |
| 2. Bestimmung der Fibrinogenkonzentration durch photometrische Registrierung der Trübung des Gerinnsels | 20 |
| 3. Qualitativer Fibrinogennachweis                                                                      | 24 |
| IV. Gelfiltration                                                                                       | 25 |
| V. Sulfitolyse                                                                                          | 25 |
| VI. Trägerfreie Elektrophorese                                                                          | 26 |
| VII. Diskelektrophorese                                                                                 | 27 |
| VIII. Ionenaustauschchromatographie                                                                     | 29 |
| IX. Bestimmung der Thrombinzeit                                                                         | 30 |
| X. Untersuchung der Fibrinpolymerisation                                                                | 31 |

|                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| XI. Vernetzbarkeit von Fibrin durch Faktor XIII                                             | 31 |
| XII. Bestimmung des Molekulargewichts und der Sedimentationskonstanten                      | 32 |
| XIII. Herstellung von hochgereinigtem Rinderfibrinogen (Fraktion I-4)                       | 32 |
| 1. Isolierung von Fibrinogen aus Rinderplasma                                               | 33 |
| 2. Reinigung des Fibrinogens nach Blombäck                                                  | 33 |
| D. Ergebnisse                                                                               | 35 |
| I. Isolierung der Fibrinogenfraktion I-GS-6                                                 | 35 |
| 1. Gewinnung und Untersuchung des Ausgangsmaterials                                         | 35 |
| 2. Löslichkeit bei verschiedenen Äthanolkonzentrationen und pH-Werten                       | 35 |
| 3. Löslichkeit in Glycinlösungen                                                            | 38 |
| 4. Reinigung von Fraktion I-GS                                                              | 39 |
| 5. Weitere Reinigungsversuche mittels trägerfreier Elektrophorese                           | 42 |
| II. Untersuchung der chemischen und biologischen Eigenschaften von Fraktion I-GS            | 45 |
| 1. Gelfiltration an Sepharose und Agarose                                                   | 46 |
| 2. Diskelektrophorese des Gesamtmaterials                                                   | 53 |
| 3. Bestimmung des Molekulargewichts und der Sedimentationskonstanten in der Ultrazentrifuge | 54 |
| 4. Bestimmung der Thrombinzeit                                                              | 55 |
| 5. Fibrinpolymerisationstest                                                                | 56 |
| 6. Test auf Faktor XIII                                                                     | 57 |
| 7. Diskelektrophorese der S-Sulfoderivate von Fibrinogen und Fibrin                         | 58 |
| 8. Ionenaustauschchromatographie der S-Sulfoderivate von Fibrinogen                         | 60 |
| E. Diskussion                                                                               | 62 |

F. Zusammenfassung

71

G. Literatur

73



## A . E I N L E I T U N G

### I. Chemische und biologische Eigenschaften des Fibrinogens

#### 1. Vorkommen, chemische und physikochemische Daten

Fibrinogen ist der gerinnbare Anteil des Blutplasmas; seine Umwandlung in das hochpolymere Fibrin stellt den entscheidenden Schritt im Mechanismus der Blutgerinnung dar.

Rudolf Virchow war der erste, der 1856 in seiner Monographie über die Blutgerinnung den Ausdruck Fibrinogen gebrauchte (1); aber erst der Franzose Denis beschrieb drei Jahre später das Fibrinogen richtig als Vorläufer des Fibrins (2).

Das Fibrinogen gehört zu den Globulinen und wandert elektrophoretisch an Celluloseacetatfolien zwischen  $\beta$ - und  $\gamma$ -Globulin (3). Seine Konzentration beträgt 2 - 4 g/l, entsprechend etwa 5 % der Plasmaproteine (4,5,6). Wie die meisten Globuline ist auch das Fibrinogen ein Glykoprotein; die Angaben über seinen Kohlenhydratanteil schwanken zwischen 1 und 5 % (7,8,9).

Das Molekulargewicht wurde nach einer Reihe von Methoden bestimmt. Beruhend auf Untersuchungen mit der Ultrazentrifuge wurden Werte zwischen 320 000 und 400 000 angegeben; das in der Literatur am häufigsten gefundene Molekulargewicht liegt bei 330 000 (10).

Das Molekül besitzt eine dimere Struktur und besteht aus drei Kettenpaaren; die Einzelketten, die durch Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind, werden mit  $\alpha$ (A),  $\beta$ (B) und  $\gamma$  bezeichnet (10). Dabei bedeuten A und B die Fibrinopeptide, kurze Peptidketten, die während des Gerinnungsvorgangs durch die Einwirkung der Protease Thrombin vom N-terminalen Ende der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette abgespalten werden. Die Ketten sind alle etwa gleichlang, mit einem Molekulargewicht von 50 - 65 000 (10,11). Charakteristisch sind ihre Aminoendgruppen: im Rinderfibrinogen enthalten die  $\alpha$ (A)-Ketten endständig Glutaminsäure, die  $\gamma$ -Ketten Tyrosin, während die  $\beta$ (B)-Ketten kein freies Aminoende

haben; Endbaustein der Kette ist hier Pyrrolidoncarbonsäure (12, 13). Carboxylendständig weisen alle Ketten Phenylalanin auf (14).

Blombäck und Mitarbeiter (15) entwickelten ein Modell, in dem aus je drei verschiedenen Peptidketten zwei Untereinheiten gebildet sind, die sich zu einem symmetrischen Dimeren zusammenlagern. Nach neueren Untersuchungen stoßen dabei nicht, wie ursprünglich angenommen, die C-terminalen, sondern die N-terminalen Enden in der Symmetrieachse des Moleküls zusammen (15a). Schematisch ist die Struktur des Fibrinogens in Abb. 1 dargestellt.

In der Nähe ihrer Aminoenden sind alle sechs Ketten durch Disulfidbrücken untereinander verbunden. Auch in den äußeren Teilen des Moleküls finden sich Cystinbrücken zwischen verschiedenen Ketten. Die Gesamtzahl der Disulfidbrücken im Fibrinogenmolekül beträgt 28 oder 29 (16).

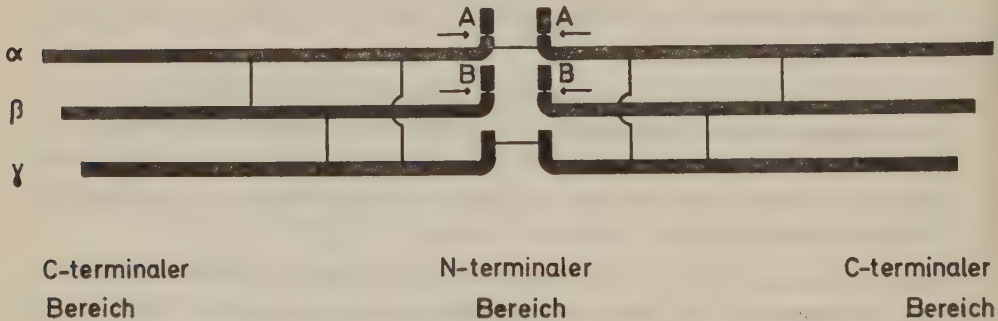


Abb. 1. Schematische Struktur des Fibrinogens in Anlehnung an Marder und Mitarbeiter (15a).

A und B stellen die Fibrinopeptide dar, die durch Thrombineinwirkung freigesetzt werden; die Pfeile zeigen den Angriffsort des Thrombins.

α, β und γ bezeichnen die Einzelketten. Die Disulfidbrücken sind durch die dünnen Querverbindungen dargestellt.

Die Molekülform des Fibrinogens wurde von Hall und Slayter aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen abgeleitet (17, 18). Danach handelt es sich um ein langgestrecktes Molekül mit einem mittleren und zwei endständigen kugelförmigen Bezirken, die durch dünne Stränge miteinander verbunden sind (Abb.2). Die Länge des gesamten Moleküls beträgt 450 Å, der Durchmesser der äußeren Kugel 60 Å, der inneren 50 Å; die Verbindungsstege haben eine Dicke von 15 Å. Messungen der optischen Rotationsdispersion (18, 19) zeigten, daß etwa 30 % der Ketten in Form von  $\alpha$ -Helices vorliegen. Möglicherweise bestehen die Verbindungsstege aus  $\alpha$ -Helices, während die Kugeln nichthelikale Bereiche darstellen. Eine zylindrische Form des Fibrinogenmoleküls ergeben neueste elektronenmikroskopische Aufnahmen nach Gefrierätzung (20).

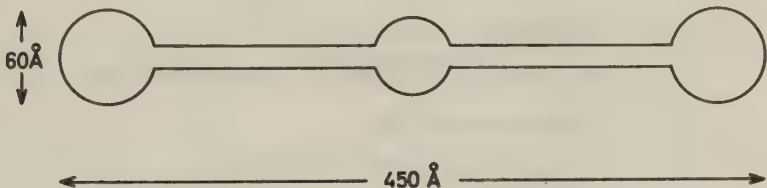


Abb. 2. Fibrinogenmolekül nach Hall und Slayter (17)

## 2. Der Gerinnungsvorgang

Die Blutgerinnung besteht in einer Folge im Plasma ablaufender Reaktionen, deren Endstufe die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin ist. Die dabei beteiligten Gerinnungsfaktoren zeigt die Tab. 1. Der gesamte Vorgang läuft in mehreren Stufen ab (21, 22), wie in Abb. 3 zu sehen ist.

Man unterscheidet folgende vier Phasen:

a) Vorphase: Bildung des Thromboplastins (Prothrombin-Aktivator)

- über das "extrinsic system". Dabei führt ein Gewebsschaden zur Freisetzung zellulärer Gewebsfaktoren, die mit den an der Gerinnung beteiligten Plasmaproteinen reagieren.

- über das "intrinsic system". Diese Reaktion findet ausschließlich im Blut statt; auslösendes Moment ist der Kontakt von Faktor XII (Hageman-Faktor) mit einer benetzbaren Oberfläche, am häufigsten einer lädierten oder

Tab. 1. Gerinnungsfaktoren

---

|        |                                              |
|--------|----------------------------------------------|
| I      | Fibrinogen                                   |
| II     | Prothrombin                                  |
| IIa    | Thrombin                                     |
| III    | Thromboplastin (Prothrombin-Aktivator)       |
| IV     | Calcium-Ionen                                |
| V + VI | Proaccelerin (Acceleratorglobulin)           |
| VII    | Proconvertin                                 |
| VIII   | Antihämophiles Globulin A                    |
| IX     | Antihämophiles Globulin B (Christmas-Faktor) |
| X      | Stuart-Prower-Faktor                         |
| XI     | Plasma-Thromboplastin-Antecedent             |
| XII    | Hageman-Faktor                               |
| XIII   | Fibrinstabilisierender Faktor (FSF)          |

---

eröffneten Gefäßwand. Weiter sind die Faktoren XI, IX, VIII, X, V,  $\text{Ca}^{++}$  sowie ein Thrombozyten-Phospholipid, der Thrombozytenfaktor 3, beteiligt. Voraussetzung für das Freiwerden des Thrombozytenfaktors ist die Zusammenballung der Blutplättchen und die Änderung ihrer Oberflächeneigenschaft, die sogenannte visköse Metamorphose. Dieselbe wird bei Berührung der Plättchen mit Bindegewebe und auch bei zahlreichen anderen Reaktionen ausgelöst.

b) 1.Phase: Bildung von Thrombin

Thrombin wird durch das Zusammenwirken der oben genannten Faktoren in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{++}$  aus einer inaktiven, im Plasma zirkulierenden Vorstufe, dem Prothrombin, gebildet. Prothrombin stammt aus der Leber, wo es in Anwesenheit von Vitamin K als Coenzym synthetisiert wird.

c) 2.Phase: Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin (Abb. 4)

Die 2.Phase beginnt mit der Abspaltung der Fibrinopeptide A und B vom Fibrinogenmolekül unter der Einwirkung von Thrombin. Dessen proteolytische Wirkung

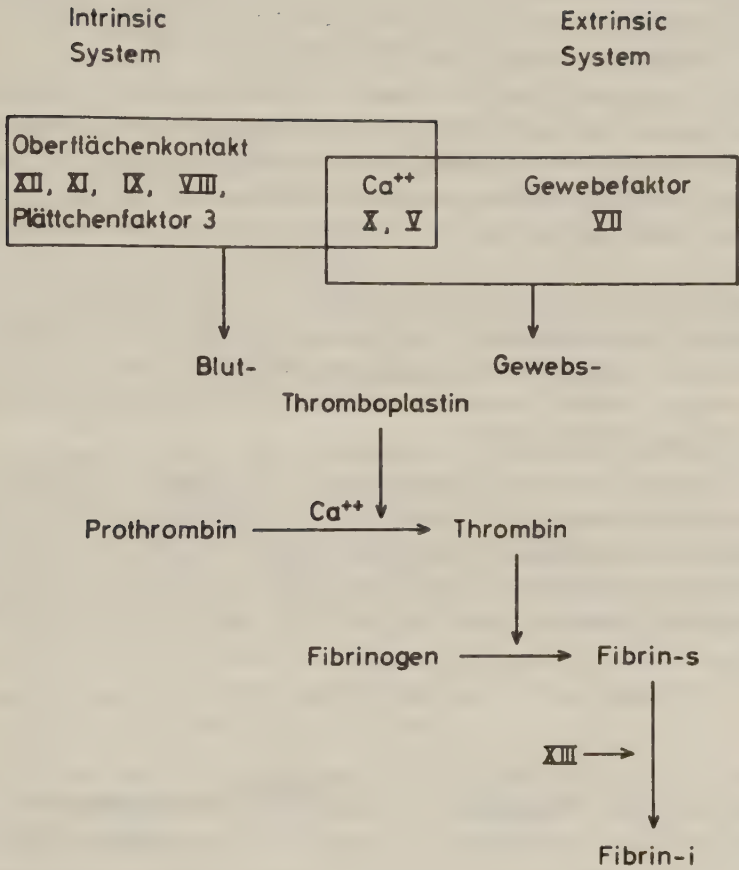


Abb. 3. Gerinnungsschema nach Biggs und MacFarlane sowie Straub und Duckert (23)

ist am Fibrinogen hochspezifisch, sodaß es am intakten Molekül nur die vier Peptidbindungen zwischen Restmolekül und Fibrinopeptiden angreift. Die abgespaltenen Peptide besitzen ein Molekulargewicht von 2000 (A) bzw. 2400 (B) und machen damit etwa 3 % des Gesamtmoleküls aus (25).

Durch die Abspaltung der stark anionischen Peptide tritt eine deutliche Veränderung der Oberflächenladung des Fibrinogens ein, das nun zum Fibrinmonomeren geworden ist (26). Diese Ladungsänderung hat Polymerisation der Monomeren zur Folge. Dabei treten zunächst lösliche Aggregate auf, wie Bang (27) durch elektronenmikroskopische Untersuchungen nachweisen konnte; ihr Molekulargewicht beträgt etwa 5 Millionen (28). Die weitere Zusammenlagerung dieser Aggregate zum dreidimensionalen Netzwerk des Fibrins ist noch nicht restlos geklärt. Sicherlich sind für den Zusammenhalt des Gerinnsels Ionenbeziehungen zwischen entgegengesetzt geladenen Gruppen (29) sowie Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Tyrosin- und Lysinresten einerseits und Histidin andererseits von Bedeutung (30).

Die zunächst geknüpften Bindungen sind durch wässrige 5 M Harnstofflösung spaltbar, weshalb man von löslichem Fibrin, Fibrin-s (s für soluble), spricht. Dieses Fibrin-s wird im letzten Reaktionsschritt der zweiten Phase unter der Einwirkung von Faktor XIII in Fibrin-i überführt, das in 5 M Harnstofflösung unlöslich (insoluble) ist. Bei Faktor XIII, dem fibrinstabilisierenden Faktor

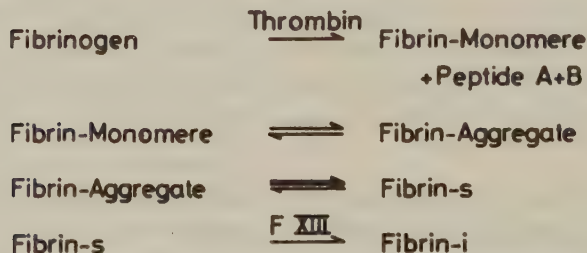


Abb. 4. Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin (24)

(FSF) oder, nach seinen Entdeckern, Laki-Lorand-Faktor (LLF), handelt es sich um ein zur Gruppe der Transpeptidasen gehörendes Enzym, das die Ausbildung kovalenter Bindungen zwischen den  $\epsilon$ -Aminogruppen spezifischer Lysinreste eines Fibrinmonomeren und den Amidgruppen bestimmter Glutaminreste eines anderen katalysiert; es entstehen  $\gamma$ -Glutamyl- $\epsilon$ -Lysin-Bindungen (31). Diese Quervernetzung kommt hauptsächlich zwischen den  $\gamma$ -Ketten zustande (32); außerdem sind daran auch die  $\alpha$ -Ketten beteiligt, während die  $\beta$ -Ketten nicht am Quervernetzungsprozeß teilnehmen (33,34). Endprodukt des bisherigen Reaktionsablaufs ist das dreidimensional vernetzte, harnstoffunlösliche Fibringerinnsel.

#### d) Nachphase: Retraktion des Gerinnsels

In der Nachphase kommt es zu einer konzentrischen Schrumpfung des entstandenen Gerinnsels, der sogenannten Retraktion. Sie beruht auf Veränderungen der im Gerinnsel eingeschlossenen Thrombozyten und stellt keine aktive Leistung des Fibrins dar.

Die physiologische Bedeutung des Gerinnungsvorgangs und seines Endprodukts Fibrin wird bei den Vorgängen der Blutstillung, der Wundheilung und bei entzündlichen Prozessen offenbar (35). Die Blutstillung ist ein komplexer Prozeß, an dem die Agglomeration der Thrombozyten, eine zeitweilige Kontraktion der verletzten Gefäße und die Blutgerinnung beteiligt sind. Dem Fibrin kommt dabei die Aufgabe eines dichten Netzwerks zu, das die zellulären Elemente zum Teil in sich aufnimmt, sich mit ihnen verflucht und den so entstandenen Thrombus an der Gefäßwand mitverankert und verfestigt. Dadurch wird der Defekt im verletzten Gefäß abgedichtet.

Neben der Blutstillung besteht die Rolle des Fibringerinnsels bei der Wundheilung vor allem darin, daß es als Gerüst und Leitstruktur für die einsprossenden Zellen und Kapillaren dient und damit zur Ausbildung eines Granulationsgewebes beiträgt, durch das die Wunde dann endgültig verschlossen wird (36).

Auch bei jedem entzündlichen Prozeß, der über eine rein seröse Exsudation hinausgeht, ist die Fibrinbildung von Bedeutung; ist sie besonders stark ausgeprägt, spricht man von fibrinöser Entzündung. Durch das Fibrin wird das Entzündungsgebiet abgegrenzt; es entsteht eine Fibrinbarriere, durch die die Erreger an ihrer freien Ausbreitung gehindert werden. Das Gerinnsel stellt hier also einen wichtigen Schutz vor dem Übergreifen des Prozesses auf die Nachbarschaft dar (37).

### 3. Fibrinolyse

Die Auflösung eines Fibringerinnsels wird als Fibrinolyse bezeichnet. Das fibrinolytische Enzym Plasmin wird in Analogie zum Gerinnungsvorgang durch Gewebe- oder Blutaktivatoren aus seiner Vorstufe, dem Plasminogen, gebildet. Plasminogen besitzt eine hohe Affinität zu Fibrinogen und Fibrin und wird in jedes in vivo entstehende Gerinnsel mit eingebaut, sodaß unter der Einwirkung der Aktivatoren Plasmin gleich am Reaktionsort freigesetzt wird. Die Spaltung von Fibrin und Fibrinogen führt zur Bildung einer Reihe von Abbauprodukten, von denen einige stark gerinnungshemmend wirken (38). Die Substratspezifität von Plasmin ist aber nicht auf Fibrin und Fibrinogen beschränkt, auch zahlreiche andere Plasmaproteine werden angegriffen (39).

### II. Isolierung von Fibrinogen

Ausgehend von den Arbeiten Hammerstens, der 1879 die Isolierung von Fibrinogen durch wiederholte Fällungen mit Natriumchlorid bei Halbsättigung beschrieb (40), wurden in der Folgezeit eine Reihe von Methoden zur Isolierung und Reinigung entwickelt. Dabei handelte es sich hauptsächlich um Fällungsverfahren; verwendet wurden anorganische Salze - neben Natriumchlorid (40) Ammoniumsulfat (41) und Phosphate (42), und Schwermetallsalze wie Kalium-Quecksilber-Tetrathiocyanat (43) -, organische Lösungsmittel wie Äthanol (44, 45) und Äther (46), sowie die Aminosäuren Glycin (47) und  $\beta$ -Alanin (48). Außerdem ist es möglich, Fibrinogen durch Kryopräzipitation zu gewinnen, wobei Plasma eingefroren und stufenweise aufgetaut wird (49). Spezielle Verfahren wurden angegeben, um spezifische Verunreinigungen von Fibrinogen abzutrennen, so die Präparation von plasminogenfreiem Fibrinogen (50) und eine Methode zur Entfernung von Faktor XIII (43). Eine weitere Reinigung von angereichertem Fibrinogen wurde mittels Ionenaustausch- (51) und Gelchromatographie (52) sowie der trägerfreien Elektrophorese (53) erreicht.

Als Standardverfahren zur Gewinnung von hochgereinigtem Fibrinogen hat sich die Aufarbeitung nach Blombäck und Blombäck (54) durchgesetzt (Abb. 5). Die Autoren verwenden Glycin-Äthanol-Puffergemische; in mehreren Fällungs- und Extraktionsschritten erfolgt die Abtrennung von ungerinnbarem und gerinnba-

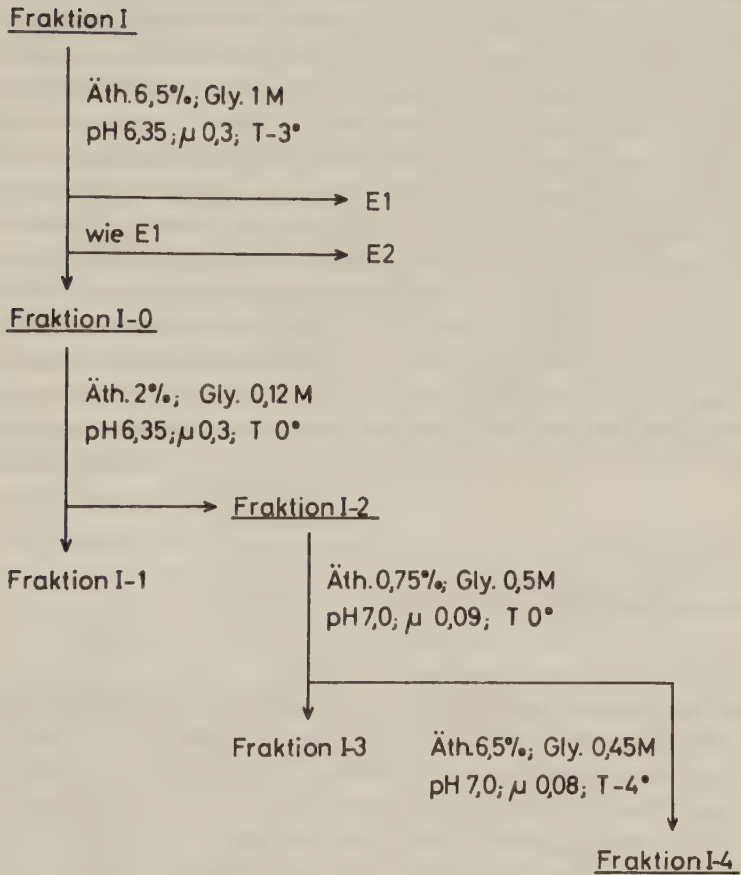


Abb. 5. Reinigung von Fibrinogen nach Blombäck und Blombäck (54)  
Ausgangsmaterial ist Fraktion I, die nach Cohn (44) aus dem Plasma durch  
Ausfällung mit 8 % Äthanol bei  $-5^{\circ}$  gewonnen wird.

rem Material mit geringerer und höherer Löslichkeit als Fibrinogen. Die Benennung der dabei erhaltenen Fraktionen erfolgt in Anlehnung an das von Cohn und Mitarbeitern (44) ausgearbeitete Plasmafraktionierungsschema. Ausgangssubstanz ist die Cohn-Fraktion I, die etwa 50 % Fibrinogen enthält. Dieses Material wird zunächst zweimal mit einem Glycin-Citrat-Äthanolgemisch extrahiert; die Glycinkonzentration ist dabei so gewählt, daß das Fibrinogen nahezu unlöslich bleibt, während die verunreinigenden Proteine in Lösung gehen. Auf diese Weise werden Prothrombin und Plasmin größtenteils entfernt, die die Stabilität von Fibrinogenlösungen erheblich beeinträchtigen. Zur weiteren Reinigung dieser als I-0 bezeichneten Fraktion werden die kaltunlöslichen Proteine (Fraktion I-1) in der Kälte mit Äthanol bei hoher Ionenstärke abgetrennt; aus der so erhaltenen Fraktion I-2 wird nach der Entfernung von Material von geringerer Löslichkeit bei niedriger Ionenstärke (Fraktion I-3) hochgereinigtes Fibrinogen, Fraktion I-4, präzipitiert. Diese Fraktion ist zu 97 - 98 % gerinnbar und macht 30 - 40 % des gesamten Plasmafibrinogens aus.

### III. Heterogenität des Fibrinogens

Eine Heterogenität des Fibrinogens wurde zuerst im Hinblick auf seine Löslichkeit festgestellt (45, 54); Finlayson und Mosesson (51) beschrieben chromatographische Unterschiede und gaben auch eine unterschiedliche Reaktivität der einzelnen Fraktionen gegenüber Plasmin an. Mit der Methode des "isoelectric focusing" konnten Krantz und Mitarbeiter (55) ebenfalls verschiedene Fraktionen darstellen. Alle diese Untersuchungen wurden mit intaktem, also nicht in seine Einzelketten zerlegten Material durchgeführt; weitere Differenzen zeigten sich bei der elektrophoretischen Untersuchung des sulfitylierten Fibrinogens, bei dem die Disulfidbrücken durch Reduktion mit Sulfit aufgelöst waren, sodaß die sechs Einzelketten ohne Vernetzung untereinander vorlagen. Bei diesen Untersuchungen wurden zwei verschiedene  $\alpha$ -Ketten (56, 57) und zwei verschiedene  $\gamma$ -Ketten (58) entdeckt, und Gaffney (59) konnte mittels "isoelectric focusing" jeweils mehrere  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Ketten nachweisen.

Mosesson und Sherry (60) gaben 1966 eine Methode zur Isolierung mehrerer

Fibrinogenfraktionen an, die sich in ihrer Löslichkeit in Äthanol-Wassergemischen voneinander unterschieden. Das von ihnen entwickelte Aufarbeitungsschema zeigt Abb. 6. Ausgangsmaterial war mit 2,1 M Glycin aus Humanplasma gefälltes Fibrinogen, das etwa 90 % des gesamten gerinnbaren Materials ausmachte. Nach einer Repräzipitation unter gleichen Bedingungen wurde die Fraktion I-1, das kaltunlösliche Material, durch Stehenlassen in der Kälte bei  $2 - 5^{\circ}$  für 6 Stunden entfernt. Aus dem zurückbleibenden Überstand wurde zunächst durch Zugabe von Äthanol in der Kälte bis zu einer Konzentration von 8 % Fraktion I-2 ausgefällt, welche den Hauptteil des Fibrinogens enthielt und weiter nach Blombäck (54) zu Fraktion I-4 gereinigt werden konnte; aus dem Überstand von Fraktion I-2 erhielt man durch eine Erhöhung der Äthanolkonzentration auf 16 % Fraktion I-5. Aus dieser wurde mit Äthanol bei einer Konzentration von 8 % Fraktion I-6, bei 16 % Fraktion I-7 ausgefällt. Fraktion I-7 wurde mit Glycin versetzt bis zu einer Konzentration von 2,1 M. Das dabei erhaltene Präzipitat stellte die Fraktion I-8 dar. Zum Überstand wurde Ammoniumsulfat bis zu  $1/3$  Sättigung gegeben; so erhielt man die Fraktion mit der höchsten Löslichkeit, I-9.

Die Unterschiede der einzelnen Fraktionen I-4, I-6, I-8 und I-9 bestanden einmal in der Löslichkeit, und zwar nicht nur in Äthanol-Wassergemischen, sondern auch in 0,01 M Phosphatpuffer, wobei auch hier die Löslichkeit von I-4 zu I-9 anstieg. Daß die höhere Löslichkeit von I-6, I-8 und I-9 gegenüber I-4 tatsächlich bestand und nicht ein Artefakt infolge der geringeren Konzentrationen dieser Proteinfractionen im Plasma war, konnte durch Fällungsversuche aus verdünnten Plasmen bewiesen werden. Hier blieb das Verhältnis von Fibrinogen im Präzipitat zu Fibrinogen im Überstand stets gleich. Weiter unterschieden sich die einzelnen Fraktionen in der Gerinnungszeit nach der Zugabe von Thrombin, der sogenannten Thrombinzeit: sie war gegenüber I-4 deutlich verlängert, und stieg von I-6 über I-8 zu I-9 an.

Von der gleichen Arbeitsgruppe wurde die Fraktion I-8 noch näher charakterisiert (61). Dieselbe wies gegenüber Fraktion I-4 eine erhöhte Wanderungsgeschwindigkeit in der Diskelektrophorese, ein niedrigeres Molekulargewicht von 280 000, eine verlängerte Thrombinzeit sowie Unterschiede im Elutionsdiagramm bei der Chromatographie an DEAE-Cellulose auf. Bei der Endgruppenbestimmung erwiesen sich die N-terminalen Aminosäuren als identisch mit denen von I-4; auch der Kohlenhydratanteil pro Mol war gleich.

Die Hypothese, daß es sich bei I-8 um ein Abbauprodukt des normalen Fibrino-

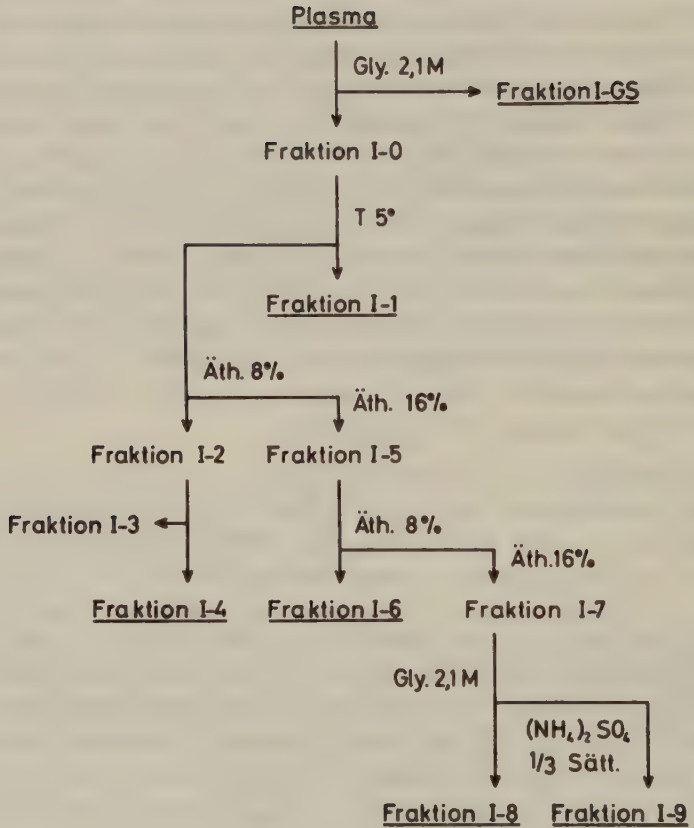


Abb. 6. Fällungsschema zur Gewinnung verschiedener Fibrinogenfraktionen nach Mosesson und Sherry (60)

gens I-4 handelt, wurde gestützt durch die Isolierung und nähere Untersuchung von in vitro gewonnenen Abbauprodukten des Fibrinogens (62). Dabei wurde Fibrinogen I-4 einer zeitlich begrenzten Plasminhydrolyse unterworfen. Das entstandene Derivat war nach elektrophoretischen Kriterien, auf Grund seiner Löslichkeit, seiner Thrombinzeit und seines Molekulargewichts mit I-8 nahezu identisch.

Zum Beweis, daß hochlösliche Fibrinogenfraktionen ganz oder zumindest zum Teil in vivo entstehende Abbauprodukte sind, wurde von Fletcher und Mitarbeitern (63) der Fibrinogenstoffwechsel am Kaninchen untersucht. Die Autoren spritzten den Tieren mit radioaktivem Schwefel markiertes I-4 ein. Nach verschiedenen Zeiten wurde das Plasma der oben erwähnten Fraktionierung nach Mosesson unterworfen und die einzelnen Anteile untersucht. Es zeigte sich, daß die Radioaktivität allmählich auf die hochlöslichen Fraktionen übergang, die also wenigstens zum Teil aus I-4 entstanden sein mußten.

Das von Mosesson und Sherry für Humanfibrinogen ausgearbeitete Fraktionierungsschema konnte von Hörmann und Rodriguez-Fernandez (64) sowie von Wuppermann und Hörmann (65, 66) auch auf Rinderfibrinogen angewendet werden. Im Gegensatz zu Humanfibrinogen aus abgelaufenen Blutkonserven, bei dem Fraktion I-8 den größten Prozentsatz an hochlöslichem Material ausmachte, fanden sich bei Fibrinogen aus frischem Rinderplasma hohe Konzentrationen von I-6 und vor allem I-9, I-8 dagegen war nur in Spuren vorhanden.

Die nähere Charakterisierung von I-6 brachte einige wesentliche Unterschiede zu I-4 zutage. Bei der Bestimmung der endständigen Aminogruppen mittels der Dinitrophenolmethode nach Sanger wurden Tyrosin und Glycin im Verhältnis 1:2 gefunden, während bei I-4 das Verhältnis von Tyrosin zu Glycin 1:1 ist; das Aminoende der dritten Kette ( $\beta$ ) von I-4 ist maskiert und liegt als Pyrrolidonsäure vor. Erst nach Abspaltung der Fibrinopeptide durch Thrombin findet man auch bei I-4 endständiges Tyrosin und Glycin im Verhältnis 1:2. Offensichtlich hat I-6 ebenfalls seine Fibrinopeptide eingebüßt und es handelt sich eventuell um monomeres Fibrin oder ein Fibrinabbauprodukt. Dafür spricht auch die chromatographische Untersuchung des sulfitolysierten Materials an CM-Cellulose. Hier zeigten die Einzelketten von I-6 ein ähnliches Verhalten wie die Ketten von I-4-Fibrin. Im Diskelektropherogramm der Einzelketten waren nur die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Banden deutlich zu sehen, neben einigen langsameren, mengenmäßig zurücktretenden Fraktionen. Eine  $\alpha$ -Bande war nur sehr schwach ausgeprägt oder fehlte ganz. I-6 gerinnt noch bei Zugabe von

Thrombin. Die Art der Thrombinwirkung ist aber unbekannt. Da die Fibrinopeptide offenbar schon abgespalten sind, kann hierin die Wirkung des Thrombins nicht mehr liegen; vielleicht ermöglicht es die Zusammenlagerung der Fibrinmonomeren. Der Test auf Faktor XIII, der sich ja in den meisten Fibrinogenfraktionen findet, war auch hier positiv. Die dadurch gleichzeitig bewiesene Fähigkeit zur Ausbildung kovalenter Bindungen spricht für die Intaktheit der  $\gamma$ -Ketten.

Die Fraktion I-9 wies die höchste Löslichkeit auf. Das Material fiel auch bei Vollsättigung mit Glycin nicht aus. I-9 besaß auch die längste Thrombinzeit; sein Molekulargewicht wurde mit der Ultrazentrifuge bestimmt und lag bei 280 000. Die Diskelektrophorese des sulfitolysierten Materials zeigte zwei Banden ähnlich  $\beta$  und  $\gamma$ , das gleiche Bild ergab auch die SDS-Diskelektrophorese. Bei der Chromatographie an CM-Cellulose erhielt man ebenfalls nur zwei Peaks, deren erster dem  $\gamma$ -Peak bei I-4 entsprach, der zweite lag zwischen  $\beta$  und  $\alpha$  von I-4. Die Bestimmung der Aminoendgruppen lieferte nur Tyrosin. Nach der Meinung der Autoren könnte es sich bei I-9 um eine besondere Art von Fibrinogen handeln, eventuell ein fetales Fibrinogen, wie es von Witt und Mitarbeitern beschrieben wurde (67).

## B . T H E M E N S T E L L U N G

Vorbemerkungen: Die vorliegende Arbeit setzt die Untersuchungen von Moseson und Sherry (60) fort. Wie in der Einleitung näher ausgeführt (siehe Seite 10) hatten diese Autoren verschiedene hochlösliche Fibrinogenfraktionen aus Plasma isoliert. Als Ausgangssubstanz diente dabei, wie auch für eine Reihe in der Folgezeit durchgeführter ähnlicher Experimente (61, 62, 64 - 66), Fibrinogen, das durch Fällung aus dem Plasma mit 2,1 M Glycin bei einer Temperatur von 5° gewonnen wurde. Bei dieser Arbeitsweise wurde aber entgegen der Annahme von Kazal und Mitarbeitern (47), die die Glycinmethode erstmals beschrieben hatten, das Fibrinogen nicht vollständig ausgefällt, sondern es blieb stets ein Rest im Überstand zurück, der bei Humanplasma 7 - 9%, bei Rinderplasma sogar 12 - 15% ausmachte. Nachdem nun bereits im Niederschlag eine Reihe von Komponenten mit höherer Löslichkeit vorhanden war, lag der Gedanke nahe, daß im Überstand hochlösliche Fraktionen angereichert vorlägen oder sich sogar Material mit noch höherer Löslichkeit finden ließe.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte versucht werden, die gerinnbaren Bestandteile, die nach Ausfällung des größten Teils des Fibrinogens aus Rinderplasma mit Glycin unter den oben erwähnten Bedingungen (Glycin 2,1 M, Temperatur 5°) im Überstand zurückbleiben, zu isolieren und näher zu charakterisieren. Dieses Material wird im folgenden als I-GS bezeichnet.

Diese Charakterisierung sollte mit Hilfe folgender Verfahren geschehen: Diskelektrophorese von Gesamtmaterial und dessen S-Sulfoderivaten, Ionenaustauschchromatographie der S-Sulfoderivate an CM-Cellulose, Ermittlung des Molekulargewichts in der Ultrazentrifuge, Bestimmung der Gerinnungszeit, photometrische Verfolgung der Fibrinpolymerisation, Untersuchung der Vernetzbarkeit des gebildeten Fibrins durch Faktor XIII.

## C. EXPERIMENTELLER TEIL

### I. Gewinnung des Plasmas aus Rinderblut

In einer Plastikwanne, in der 500 ml Citratpuffer<sup>+</sup> vorgelegt waren, wurden 4,5 l Blut aus der Arteria carotis eines frisch geschlachteten Rindes unter ständigem vorsichtigen Rühren aufgefangen. Das Blut wurde in eine vorgekühlte Plastikflasche gefüllt und während des Transports mit Eis gekühlt. Sofort anschließend - etwa eine halbe Stunde nach der Schlachtung - wurde eine Stunde lang bei 4° und 1450 g zentrifugiert und das Plasma von den zellulären Bestandteilen abpipettiert. Es wurde sofort weiterverarbeitet.

<sup>+</sup>Citratpuffer:

|                            |         |
|----------------------------|---------|
| Tri-Natriumcitrat-2-Hydrat | 0,127 M |
| ε-Aminocapronsäure         | 0,100 M |
| D-Glukose                  | 0,125 M |

pH 7,4 wurde mit gesättigter Citronensäurelösung eingestellt.

### II. Fällungsverfahren

Alle Fällungen wurden unter ständiger Temperaturkontrolle im Kryostaten bzw. in einzelnen Fällen ( $\beta$ -Alaninfällungen) auch im Eisbad durchgeführt. Die Ansätze wurden mit konstanter Geschwindigkeit gerührt und jede Schaumbildung vermieden.

Äthanol-fällungen wurden stets bei Temperaturen unter 0° durchgeführt. Äthanol wurde mit Wasser oder Pufferlösung verdünnt und immer vorgekühlt aus einer mit einem Kühlmantel versehenen und an den Kryostaten angeschlossenen Burette tropfenweise zugegeben, und zwar so langsam, daß die Temperatur im

Gemisch nicht über  $0^{\circ}$  anstieg. Bei höherer Temperatur oder bei Schaumbildung besteht die Gefahr der Denaturierung von Protein (44). Die Dauer der Äthanol-fällungen betrug 30 Minuten.

Für die Untersuchung der Löslichkeit wurde die zu untersuchende Lösung mit der gleichen Menge eines Äthanol-Puffer-Gemisches versetzt, das folgendermaßen bereitet worden war: 50 ml Phosphatpuffer<sup>+</sup> wurden mit der jeweils benötigten Menge Äthanol (18 - 48 ml) vermischt und mit Aqua bidest. auf 100 ml aufgefüllt. Die Mischung hatte eine Ionenstärke von 0,15 und einen pH von 7,2. Glycinhaltige Lösungen wie etwa der Plasmaüberstand nach Glycinfällung wurden vor der Prüfung dreimal 12 Stunden bei  $6^{\circ}$  gegen eine Mischung dialysiert, die 0,15 M NaCl, 0,02 M Tri-Na-citrat-2-Hydrat und 0,015 M  $\epsilon$ -Aminocaprinsäure enthielt bei einem pH von 7,2 (eingestellt mit konz. HCl).

<sup>+</sup>Phosphatpuffer pH 7,2:

8,76 g NaCl

15,94 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$

2,30 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

mit Aqua bidest. auf 1000ml aufgefüllt, pH falls erforderlich mit konz.  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - bzw.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung nachgestellt.

Glycinfällungen (47) wurden vorgenommen durch langsame Zugabe von festem, sehr fein gemahlenen Glycin. Die Temperatur betrug  $4^{\circ}$ . Zur vollständigen Präzipitation war eine Fällungsdauer von zwei Stunden notwendig.

Zur Fällung mit  $\beta$ -Alanin wurde eine 5 M  $\beta$ -Alaninlösung bei Raumtemperatur tropfenweise zugegeben und die Mischung anschließend im Eisbad für 30 Minuten gerührt.

Ammoniumsulfatfällungen wurden mit einer bei  $4^{\circ}$  gesättigten  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung durchgeführt, die mit Ammoniak auf einen pH von 5,4 eingestellt war. Die Lösung wurde tropfenweise unter ständigem Rühren zugegeben; die Temperatur betrug  $4^{\circ}$ , die Fällungsdauer 30 Minuten.

Das präzipitierte Protein wurde abzentrifugiert; verwendet wurden Zentrifugen vom Typ Sorvall Superspeed RC2-B bzw. MSE Superspeed 50, die mit 8 - 10 000 g für 20 Minuten gefahren wurden. Die Fibrinogen enthaltenden Niederschläge wurden in Citratsaline vom pH 7,4<sup>+</sup> aufgelöst.

<sup>+</sup>Citratsaline pH 7,4:

|                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| NaCl                             | 0,15 M |
| Tri-Natriumcitrat-2-Hydrat       | 0,02 M |
| pH 7,4 eingestellt mit konz. HCl |        |

### III. Bestimmung des Fibrinogengehalts und der Gerinnbarkeit

#### 1. Photometrische Bestimmung nach Überführung des Fibrinogens in Fibrin

Verwendet wurde die Methode von Blombäck (54) in der Modifikation von Hörmann und Gollwitzer (9). Dabei wurde in einem 25 ml Becherglas 1 ml der zu untersuchenden fibrinogenhaltigen Lösung mit 2 ml Phosphatpuffer<sup>+</sup> versetzt. Unter vorsichtigem Schütteln wurden dann 0,15 ml einer wässrigen Thrombinlösung<sup>++</sup> zugegeben. Das entstandene Gerinnsel wurde nach zwei Stunden zur Synärese auf ein Seidentuch gebracht, das mit mehreren Schichten Filterpapier unterlegt war. Es bildete sich ein zartes Fibrinhäutchen, das mit einem Spatel vorsichtig von der Seide abgehoben und in 10 ml einer alkalischen Harnstofflösung<sup>+++</sup> überführt wurde. Nach vollständiger Auflösung des Fibrinhäutchens, frühestens nach einer Stunde, wurde 1 ml Citratsaline (siehe oben) zugegeben. Gleichzeitig mit der Auflösung des Häutchens wurde 1 ml der zum Test verwendeten Fibrinogenlösung mit 10 ml der oben angegebenen Harnstofflösung vermischt. Im Zeitraum zwischen 1 und 3 Stunden nach Zugabe des Fibrinhäutchens bzw. der Fibrinogenlösung zur Harnstofflösung wurden die Extinktionen der Ansätze bei 283 m $\mu$  und 320 m $\mu$  in 1 cm Quarzküvetten gemessen; verwendet wurde ein Spektralphotometer vom Typ Beckman DU.

Der Fibrinogengehalt der Lösung und die Gerinnbarkeit, d.h. der prozentuale Anteil des gerinnbaren Materials am Gesamtprotein, wurden mit Hilfe der Extinktionsdifferenzen  $\Delta E$  aus den jeweils bei 283 m $\mu$  bzw. 320 m $\mu$  erhaltenen Werten auf folgende Weise berechnet:

Der Fibrinogengehalt ergibt sich aus den Extinktionswerten der Fibrinlösung nach der Formel

$$(1) \quad c_{F, \text{gen}} \text{ (mg/ml)} = \frac{\Delta E \cdot 10 \cdot 11}{16,16}$$

wobei 16,16 die spezifische Extinktionsdifferenz  $\Delta \epsilon_{\text{cm}}^{1\%}$  für Fibrin in 6 M alkalischer Harnstofflösung darstellt (9). Vereinfacht ergibt sich

$$(1') \quad c_{F',\text{gen}} \text{ (mg/ml)} = 6,81 \cdot \Delta E$$

Die Gerinnbarkeit erhält man aus dem Verhältnis der Extinktionsdifferenzen von Fibrinlösung und fibrinogenhaltiger Lösung:

$$(2) \text{ Gerinnbarkeit (\%)} = \frac{\Delta E_{\text{Fibrin}}}{\Delta E_{F',\text{gen}}} \cdot 100$$

Da dieser Bestimmung die Überführung des Fibrinogens in Fibrin zugrunde liegt, wird nicht Fibrinogen, sondern Fibrin zum Gesamtprotein in Beziehung gesetzt. Die Masse des Fibrins ist aber geringer als die des Fibrinogens, da durch Thrombin die Fibrinopeptide abgespalten wurden, die etwa 2 - 3% des Fibrinogenmoleküls ausmachen. Daher ist die nach dieser Methode bestimmte Gerinnbarkeit selbst bei einer zu 100% reinen Fibrinogenlösung nur ungefähr 98%.

Für Lösungen, deren Fibrinogengehalt unter 1 mg/ml lag, wurde folgender Gerinnungsansatz verwendet:

2,5 ml fibrinogenhaltige Lösung + 2 ml Phosphatpuffer + 0,225 ml Thrombinlösung.

Die  $\Delta E$ -Werte der Fibrinlösung müssen in diesem Fall durch 2,5 dividiert werden, bevor sie in obige Formeln eingesetzt werden können.

Diese Methode wurde für die meisten Fibrinogenbestimmungen angewendet; dabei wurden stets Doppelbestimmungen durchgeführt.

Erwähnt sei, daß sich bei Lösungen niedriger Gerinnbarkeit Ungenauigkeiten dadurch ergeben, daß von dem entstehenden Gerinnsel in unkontrollierbarem Ausmaß nichtgerinnbare Anteile mitgerissen werden. Diese Verunreinigungen des Gerinnsels sind außer von der Relation zwischen nichtgerinnbaren und gerinnbaren Anteilen auch noch von der Grundfläche des zur Gerinnung verwendeten Gefäßes und der Art der verunreinigenden Proteine - vor allem Lipoproteide scheinen eine hohe Affinität zu Fibrin zu besitzen - abhängig. Nach den Untersuchungen von Morrison (68) und Blombäck (54) sind diese Fehler bei den pH- und Ionenbedingungen der angegebenen Methode am geringsten; bei einem Verhältnis von nichtgerinnbarem zu gerinnbarem Material von 10 - 20 : 1, wie es etwa im Plasma vorliegt, beträgt der durchschnittliche Fehler 3 - 4%.

+Phosphatpuffer zur Gerinnungsbestimmung pH 6,35:

1,30 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$

1,55 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

4,38 g NaCl

mit Aqua bidest. auf 1000 ml aufgefüllt, pH 6,35 wenn nötig eingestellt mit konz.  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - bzw.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung.

++Thrombinlösung:

Der Inhalt eines Fläschens Thrombin (Thrombinum purum der Firma Behringwerke AG) mit 100 NIH-Einheiten in 1 ml Aqua bidest. gelöst.

+++40 % ige alkalische Harnstofflösung:

Harnstoff 6,6 M

NaOH 0,2 M

## 2. Bestimmung der Fibrinogenkonzentration durch photometrische Registrierung der Trübung des Gerinnsels

Diese Methode kam zur Anwendung, wenn nur sehr geringe Substanzmengen zur Verfügung standen, wie bei der Bestimmung des Fibrinogengehalts säulenchromatographisch aufgetrennter Fraktionen oder nach einer Auftrennung mit der trägerfreien Elektrophorese.

Sie wurde erstmals von Ellis und Stransky (69) beschrieben und von Burmeister und Mitarbeitern (70) modifiziert. Sie wurde von mir etwas abgeändert, um sie auch mit geringeren Substanzmengen durchführen zu können. Vergleichsmessungen mit der unter 1. angeführten Methode ergaben gute Übereinstimmung bei Werten bis zu 0,05 mg/ml (Abb. 7). (Werte unter 0,2 mg/ml waren mit der Methode nach Blombäck nicht mehr sicher zu bestimmen; Vergleichslösungen mit Konzentrationen unter 0,2 mg/ml wurden daher durch Verdünnen einer Eichlösung der Konzentration 1 mg/ml hergestellt.)

Da während der vorliegenden Arbeit der Fibrinogengehalt in Lösungen mit sehr unterschiedlicher Gerinnbarkeit bestimmt werden mußte, wurde der Einfluß von Fremdproteinen auf die gemessene Fibrinogenkonzentration untersucht, nachdem verschiedene Mengen Serumprotein zu Lösungen mit definierter Fibrinogenkon-

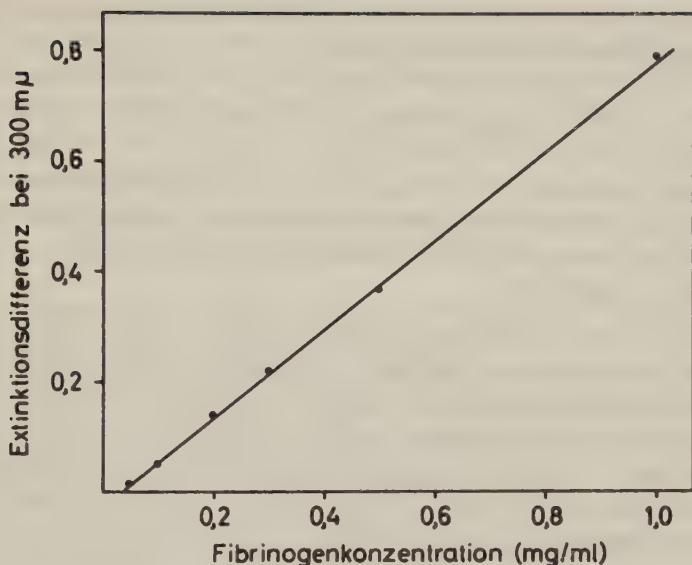


Abb. 7. Modifizierte Fibrinogenbestimmung nach Burmester und Mitarbeitern (70). Ordinate: Differenz der Extinktionen vor und 15 Minuten nach Thrombinzugabe, gemessen bei 300  $m\mu$ . Abszisse: Fibrinogenkonzentration der Vergleichslösungen, ermittelt mit der Methode von Blombäck (9, 54).

zentration zugemischt worden waren. Es wurde jedoch auch bei zehnfach höherer Konzentration an Fremdproteinen keine merkliche Beeinflussung der Meßwerte festgestellt.

Im einzelnen wurde folgendermaßen vorgegangen:

0,5 ml der zu untersuchenden Fibrinogen enthaltenden Lösung wurden in einer 1 cm Quarzküvette mit 2,5 ml Natriumbarbituratpuffer<sup>+</sup> vermischt. Die Extinktion dieser Mischung bei 300  $m\mu$  wurde in einem Spektralphotometer (Beckman DU) gegen Natriumbarbituratpuffer als Leerwert ermittelt. Anschließend wurden zur Testlösung 0,015 ml Calcium-Thrombinreagenz gegeben, sorgfältig gemischt, wobei Blasenbildung vermieden wurde, und nach 15 Minuten erneut die Extinktion bei 300  $m\mu$  gemessen. Aus der Differenz der Extinktions-

werte vor und 15 Minuten nach Zugabe des Thrombins errechnete sich die Fibrinogenkonzentration nach der Formel

$$(3) \quad c_{\text{F'gen}} \text{ (mg/ml)} = 1,28 \cdot \Delta E + 0,03$$

Der Faktor 1,28 stellt die Steigung der Eichgeraden (Abb. 7) dar, die den Zusammenhang zwischen Fibrinogenkonzentration und Extinktionsdifferenz wiedergibt. Der Wert 0,03 ist der Abstand des Schnittpunkts der Geraden mit der Abszisse vom Nullpunkt.

Die von mir gefundene Steigung der Eichgeraden ist mit 1,28 geringer als sich aus den Angaben der Originalmethode von Burmester ergibt. Der dort angegebene Wert von 320 entspräche, auf die Verhältnisse der Modifikation (Konzentrationsangaben in mg/ml gegenüber mg/100 ml, sowie zur Erreichung größerer Empfindlichkeit eine doppelt so hohe Fibrinogenkonzentration) umgerechnet, einem Wert von 1,6. Der Grund für diese Differenz liegt offenbar darin, daß die Originalmethode für die Untersuchung von Gesamtplasma entwickelt wurde, während bei der hier beschriebenen Modifikation Lösungen von hochgereinigtem Fibrinogen (Fraktion I-4 nach Blombäck) zur Anwendung kamen.

Für eine Erklärung kann man folgende Beobachtung heranziehen: Verschiedene Fibrinogenfraktionen, deren Fibrinogengehalt, nach der Methode von Blombäck gemessen, gleich war, zeigten sehr unterschiedliche Werte für  $\Delta E$  bei Anwendung der hier beschriebenen Methode. So ergab sich für eine Lösung der Fraktion I-GS, deren Fibrinogengehalt nach der Methode von Blombäck identisch war mit dem einer Lösung von I-4, nur eine halb so hohe Extinktionsdifferenz  $\Delta E$  wie für letztere.

Die Extinktionsdifferenz, die hier als Maß für den Fibrinogengehalt verwendet wird, entsteht durch die Trübung, die beim Gerinnungsvorgang eintritt. Diese Trübung ist abhängig vom Polymerisationsgrad des Gerinnsels und damit von der Polymerisationsfähigkeit des untersuchten Fibrinogens. Nachdem man nun für verschiedene Fraktionen unterschiedliche Extinktionsdifferenzen bei gleicher Fibrinogenkonzentration findet, kann man annehmen, daß die Polymerisationsfähigkeit der einzelnen Fibrinogenfraktionen verschieden ist. Dadurch ist auch das unterschiedliche Verhalten von hochgereinigtem I-4 und Fibrinogen im Plasma zu erklären; letzteres stellt ja ein Gemisch aus verschiedenen Fibrinogenfraktionen dar (siehe Einleitung Seite 10).

Für die hier beschriebene Fibrinogenbestimmung folgert daher, daß sie nur auf genau definierte Fibrinogenfraktionen oder Gemische aus einzelnen Fraktionen angewendet werden darf, für die sie vorher geeicht wurde. So ergibt sich für die hochlösliche Fraktion I-GS in Abänderung von Formel (3), die aus Versuchen mit Fraktion I-4 entwickelt wurde, näherungsweise folgende Formel zur Fibrinogenbestimmung:

$$(4) \quad c_{\text{Fibrinogen}} \text{ (mg/ml) } = 0,75 \cdot \Delta E + 0,02$$

Daß die oben erwähnten Abweichungen zwischen den einzelnen Fraktionen nicht auf den Einfluß der ungerinnbaren Anteile zurückzuführen sind, die im Gesamtplasma immerhin 90 % ausmachen, zeigt die folgende Untersuchung. Es wurde die Auswirkung von Fremdproteinen auf die Extinktionsdifferenzen studiert, die nach der oben beschriebenen Methode gemessen worden waren. Dabei wurde Serumprotein, das nach Ausfällung des gerinnbaren Materials bei 56° für 10 Minuten (71, 72) aus Plasma im Überstand verblieben war, in verschiedenem Verhältnis mit Fibrinogenlösungen genau definierter Konzentration vermischt, und nach obiger Methode die Extinktionsdifferenz  $\Delta E$  bestimmt. Es ergaben sich keine wesentlichen Abweichungen von den Werten, die mit reinen Fibrinogenlösungen erhalten worden waren. Das war auch nicht bei zehnmal höherer Serumproteinkonzentration der Fall, was etwa den Verhältnissen im Plasma entspricht (Tab. 2).

<sup>+</sup>Natriumbarbituratpuffer 0,1 M, pH 7,2:

2,93 g NaCl und 5,71 g Na-Diäthyl-Barbiturat werden in etwa 900ml Aqua bidest. gelöst und mit 1,0 N HCl auf pH 7,2 eingestellt. Anschließend wird mit Aqua bidest. auf 1000 ml aufgefüllt.

<sup>++</sup>Calcium-Thrombinreagenz:

Der Inhalt eines Fläschchens Thrombin mit 100 NIH-Einheiten wird in 2 ml 0,15 M NaCl gelöst und 2 ml einer 3,38 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung zugegeben.

Tab. 2. Untersuchung des Einflusses von Serumproteinen in verschiedenen Konzentrationen auf die Fibrinogenbestimmung nach der modifizierten Methode nach Burmester (70)

| F'genkonz.<br>(mg/ml) | F'gen : Serum-<br>protein | Gerinnbarkeit<br>(%) | $\Delta E_{300}$ |
|-----------------------|---------------------------|----------------------|------------------|
| 1,0                   | -                         | 98                   | 0,82             |
| 1,0                   | 10 : 1                    | 91                   | 0,80             |
| 1,0                   | 2 : 1                     | 67                   | 0,82             |
| 1,0                   | 1 : 1                     | 50                   | 0,79             |
| 1,0                   | 1 : 5                     | 17                   | 0,78             |
| 1,0                   | 1 : 10                    | 9                    | 0,77             |
| 0,1                   | -                         | 98                   | 0,052            |
| 0,1                   | 10 : 1                    | 91                   | 0,048            |
| 0,1                   | 2 : 1                     | 67                   | 0,051            |
| 0,1                   | 1 : 1                     | 50                   | 0,048            |
| 0,1                   | 1 : 10                    | 9                    | 0,052            |

### 3. Qualitativer Fibrinogennachweis

Nach Trennungen mittels Gelchromatographie oder trägerfreier Elektrophorese wurden die einzelnen proteinhaltigen Fraktionen zunächst qualitativ auf Fibrinogen untersucht. Dazu wurden in einem Reagenzglas je 0,2 ml der zu untersuchenden Lösung mit 0,05 ml einer wässrigen Thrombinlösung (100 NIH-Einheiten/ml) versetzt. Nach einer halben Stunde konnte das Vorhandensein von Fibrinogen selbst in Spuren noch an der aufgetretenen Trübung bzw. daran, daß beim Kippen der Röhrchen der Meniskus seine Lage nicht mehr veränderte, erkannt werden.

#### IV. Gelfiltration

Für die Gelfiltration gelangten Sepharose (Sephadex G-200 der Firma Pharmacia, Uppsala) und Agarose (Bio-Gel AS und A15, 100 - 200 US-Mesh der Firma Bio-Rad Laboratories GmbH) zur Anwendung. Es wurde aufsteigend chromatographiert und das Eluat in einem Fraktionssammler aufgefangen. Die Extinktion wurde bei 281 m $\mu$  im Durchflußphotometer (Uvicord der Firma LKB Stockholm) fortlaufend gemessen und durch einen Papierschreiber aufgezeichnet. Als Elutionspuffer wurde Citratsaline, pH 7,4, benutzt. Die aufgetragene Menge schwankte zwischen 20 und 80 mg in 4 - 8 ml. Alle Versuche fanden bei Raumtemperatur statt.

Die Laufbedingungen bei den einzelnen Gelarten waren:

Sephadex G-200: Säule 2,5 x 76 cm, Durchflußgeschwindigkeit 8,2 ml/h; das Eluat wurde in Fraktionen zu je 4,1 ml gesammelt.

Bio-Gel A-5: Säule 2,5 x 86 cm, Durchflußgeschwindigkeit 7,1 ml/h, Fraktionen zu je 3,55 ml.

Bio-Gel A-15: Säule 2,5 x 77 cm, Durchflußgeschwindigkeit 13,5 ml/h, Fraktionen zu je 4,5 ml.

#### V. Sulfitolyse

Die Sulfitolyse wurde nach der Methode von Henschen (75) durchgeführt.

66 mg Fibrin-s oder Fibrinogen wurden in 5 ml 9 M Harnstofflösung gelöst und anschließend 12 Stunden gegen die gleiche Lösung dialysiert, um etwaige Verunreinigungen durch Fällungsreagenzien (Ammoniumsulfat) zu entfernen. Sodann wurden unter starkem Rühren und ständiger pH-Kontrolle mittels eines pH-Meters 0,93 ml gesättigte Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung und anschließend portionsweise 0,33 ml 1 M CuSO<sub>4</sub>-Lösung zugegeben. Mit verdünnter Salzsäure bzw. Ammoniaklösung wurde der pH-Wert zwischen 8,5 und 9,0 gehalten. Die Reaktionsmischung wurde zwei Stunden stark gerührt und dabei pH-Abweichungen sofort korrigiert.

Standen nur sehr geringe Fibrinogen- bzw. Fibrinmengen zur Verfügung, wurde

folgender Ansatz verwendet: 5 mg Fibrinogen bzw. Fibrin wurden in 4 ml 9 M Harnstofflösung gelöst und wie oben dialysiert. Bei der Sulfitolyse wurden 0,1 ml gesättigte  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ -Lösung und 0,036 ml 1 M  $\text{CuSO}_4$ -Lösung zugegeben. Nach diesem Ansatz behandeltes Fibrinogen der Fraktion I-4 unterschied sich bei der diskoelektrophoretischen Untersuchung nicht vom gleichen Material, das nach der Originalmethode sulfitolytisch behandelt worden war.

Nach beendeter Sulfitolyse wurden die entstandenen S-Sulfoderivate durch mehrfache, jeweils zwölfstündige Dialysen bei  $6^\circ$  von den überschüssigen Reagenzien befreit. Die Dialysebäder hatten nacheinander folgende Zusammensetzung:

1. 0,02 N HCl, mit  $\text{NH}_3$  auf pH 9,0 eingestellt
2. 0,01 N HCl, enthaltend 0,01 M Natrium-Äthylendiamintetraessigsäure (Na-EDTA), mit  $\text{NH}_3$  auf pH 8,5 eingestellt
3. und 4. 0,05 N HCl, 0,05 N Na-EDTA, mit  $\text{NH}_3$  auf pH 8,5 eingestellt
5. und 6. Aqua dest., mit  $\text{NH}_3$  auf pH 8,5 eingestellt

Nach der Dialyse wurden die Proben entweder sofort weiterverwendet oder bei  $-20^\circ$  eingefroren.

## VI. Trägerfreie Elektrophorese

Es wurde ein Gerät vom Typ VAP II nach Hannig (73) mit vertikaler Trennkammer verwendet. Die untersuchten Fibrinogenlösungen hatten eine Konzentration von 8 mg/ml und wurden vor dem Lauf zweimal zwölf Stunden gegen Kammerpuffer dialysiert. Für die Auftrennungen wurden die von van der Bosch (74) angegebenen Bedingungen gewählt: Geschwindigkeit des Kammerpufferflusses 210 ml/h, Substanzeingabe mit 2 ml/h, Kammertemperatur  $10^\circ$ . Die Stromstärke betrug 190 mA, die Spannung 1300 V.

### Verwendete Pufferlösungen:

#### Elektrodenpuffer:

|               |                    |
|---------------|--------------------|
| Citronensäure | 0,06 M             |
| Natriumacid   | 0,25 g/l           |
| pH            | 6,2                |
| Leitfähigkeit | 4500 $\mu\text{S}$ |

Kammerpuffer:

|               |          |
|---------------|----------|
| Citronensäure | 0,02 M   |
| Saccharose    | 0,50 M   |
| Natriumacid   | 0,25 g/l |
| pH            | 6,2      |
| Leitfähigkeit | 1500 S   |

Der pH-Wert beider Pufferlösungen wurde mit gesättigter Tris-Lösung eingestellt.

VII. Diskelektrophorese

Diese Untersuchungen wurden nach der von Ornstein angegebenen Methode (76, 77) in einer Apparatur der Firma Pleuger, die acht Trennröhrchen mit Polyacrylamidgel aufnehmen konnte, durchgeführt. Die Laufdauer betrug 4 bzw. 6 Stunden bei einer Temperatur von 6°; der pH-Wert war 8,3, die Stromstärke 3 - 4 mA pro Gel. Die Konzentration der verwendeten Polyacrylamidgele (Trenngele) war für die Untersuchung von intaktem, nicht sulfitolysiertem Material 4 %, für die Elektrophorese der S-Sulfoderivate 7,5 %.

Lösungen zur Herstellung der Gele:

|    |                                    |           |
|----|------------------------------------|-----------|
| A: | 1 N HCl                            | 48 ml     |
|    | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan    | 36,6 g    |
|    | N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin | 0,23 ml   |
|    | Aqua dest.                         | ad 100 ml |
| B: | Acrylamid                          | 30,0 g    |
|    | N,N'-Methylenbisacrylamid          | 0,8 g     |
|    | 3 M Harnstofflösung                | ad 100 ml |
| C: | Ammoniumperoxodisulfat             | 0,14 g    |
|    | 9 M Harnstofflösung                | ad 100 ml |
| D: | 1 M Phosphorsäure                  | 25,6 ml   |
|    | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan    | 5,7 g     |
|    | 6 M Harnstofflösung                | ad 100 ml |

|    |                           |           |
|----|---------------------------|-----------|
| E: | Acrylamid                 | 10,0 g    |
|    | N,N'-Methylenbisacrylamid | 2,5 g     |
|    | 6 M Harnstofflösung       | ad 100 ml |
| F: | Riboflavin                | 4,0 g     |
|    | 6 M Harnstofflösung       | ad 100 ml |

Gelzusammensetzung:

|                 |                      |                           |
|-----------------|----------------------|---------------------------|
| 4 % ige Gele:   | Untergel (Trenngel): | 2 ml A                    |
|                 |                      | 2,12 ml B                 |
|                 |                      | 3,88 ml 6 M Harnstofflsg. |
|                 |                      | 8 ml C                    |
|                 | Obergel (Sammelgel): | 1 ml D                    |
|                 |                      | 2 ml E                    |
|                 |                      | 1 ml F                    |
|                 |                      | 4 ml 6 M Harnstofflsg.    |
| 7,5 % ige Gele: | Untergel:            | 2 ml A                    |
|                 |                      | 4 ml B                    |
|                 |                      | 2 ml 6 M Harnstofflsg.    |
|                 |                      | 8 ml C                    |
|                 | Obergel:             | 1 ml D                    |
|                 |                      | 2 ml E                    |
|                 |                      | 1 ml F                    |
|                 |                      | 4 ml 6 M Harnstofflsg.    |

Laufpuffer:

|                                 |            |
|---------------------------------|------------|
| Tris(hydroxymethyl)-aminomethan | 6,0 g      |
| Glycin                          | 28,8 g     |
| Aqua dest.                      | ad 1000 ml |
| pH                              | 8,3        |

Herstellung der Gele:

Zunächst wurden alle Gelröhrchen in gleicher Höhe - etwa 1 cm unter dem oberen Rand - markiert. Anschließend wurden die Röhrchen am unteren Ende mit einem Gummistopfen verschlossen, die frisch zubereitete Trenngelmischung

(etwa 1,5 ml) bis zur Markierung einpipettiert und mittels einer Injektionsspritze vorsichtig 1 - 2 mm hoch mit Wasser überschichtet. Nach Polymerisation des Gels bei Tageslicht für etwa 30 Minuten wurde die Wasserschicht mit einem Stückchen Filterpapier sorgfältig abgesaugt und auf das Untergel 0,15 ml der frisch hergestellten Sammelgellösung pipettiert. Diese wurde anschließend wieder mit Wasser überschichtet und die Gelröhrchen zur Polymerisation des Sammelgels 60 Minuten unter eine UV-Lampe gestellt.

#### Auftragen der Substanzproben:

Alle Proben wurden vor der Analyse 12 Stunden lang gegen 6 M Harnstofflösung dialysiert. Die aufgetragenen Substanzmengen betrugen 50 - 100  $\mu$ g; es wurden jeweils 0,2 ml einer Lösung mit einer Proteinkonzentration von 0,25 - 0,50 mg/ml sofort nach Entfernung der Wasserschicht auf das Polyacrylamidgel aufgetragen und vorsichtig mit Lauffuffer bis zum oberen Rand des Röhrchens überschichtet.

#### Anfärben der Gele:

Unmittelbar nach Beendigung eines Laufes wurden die Gele aus den Gelröhrchen gelöst und in einer Amidoschwarzlösung (1 % Amidoschwarz in 7 % Essigsäure) für 15 Minuten gefärbt. Die überschüssige Farbe wurde in einem Bad mit 7 % Essigsäure, die mehrfach gewechselt wurde, in 24 - 36 Stunden entfernt.

#### VIII. Ionenaustauschchromatographie

Es wurde nach dem von Clegg und Bailey (78) sowie von Henschen (79) angegebenen Verfahren vorgegangen. Zur Untersuchung gelangten die durch Sulfolyse gewonnenen S-Sulfoderivate des Fibrinogens. Diese wurden zunächst zwölf Stunden bei Raumtemperatur gegen 8 M Harnstofflösung vom pH 8,5 und anschließend ebenfalls zwölf Stunden bei Raumtemperatur gegen Startpuffer<sup>†</sup> dialysiert.

Die Trennung erfolgte an CM-Cellulose (Whatman "advanced" Ionenaustauschcellulose CM 52 ). Diese wurde in eine Säule von 2,5 cm Durchmesser und 20 cm Länge gepackt und mit Startpuffer solange äquilibriert, bis der durch die

Säule geflossene Puffer seinen ursprünglichen pH-Wert von 5,3 erreicht hatte. Es wurden 60 mg S-Sulfofibrinogen in 14 ml aufgetragen.

Die Entwicklung des Chromatogramms fand bei Raumtemperatur unter Benutzung eines linearen Natriumacetatgradienten von 0,005 M Na-Acetat zu 0,100 M Na-Acetat statt. Der Gradient wurde durch kontinuierliche Mischung von je 500 ml Start- und Endpuffer<sup>++</sup> in einem zweikammrigen Gradientengefäß erreicht. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 120 ml/h, das Eluat wurde in 10 ml Fraktionen aufgefangen und seine Extinktion bei 281 m $\mu$  wie bei der Gelfiltration registriert.

<sup>+</sup> Startpuffer:

|           |       |   |
|-----------|-------|---|
| Harnstoff | 8,0   | M |
| Na-Acetat | 0,005 | M |
| pH        | 5,3   |   |

<sup>++</sup> Endpuffer:

|           |       |   |
|-----------|-------|---|
| Harnstoff | 8,0   | M |
| Na-Acetat | 0,100 | M |
| pH        | 5,3   |   |

Der pH-Wert wurde mit Eisessig eingestellt.

## IX. Bestimmung der Thrombinzeit (80)

Um genau definierte Bedingungen zu erhalten, wurden alle zu untersuchenden Lösungen auf eine Fibrinogenkonzentration von 4 mg/ml gebracht und 12 Stunden bei 6° gegen Citratsaline, pH 7,4, dialysiert. 0,2 ml der so vorbereiteten Lösung wurden in ein Reagenzglas pipettiert und genau 1 Minute in einem Wasserbad von 37° vorgewärmt. Dann wurden aus einer Tuberkulinspritze 0,2 ml einer eisgekühlten Thrombinlösung<sup>+</sup> zugespritzt, unmittelbar nach der Thrombinzugabe eine Stoppuhr in Gang gesetzt und 1 - 2 mal pro Sekunde ein Glas-  
haken durch das Gemisch geführt. Beim Auftreten des ersten Fibrinfadens wurde die Stoppuhr arretiert; die abgelesene Zeit war die Thrombinzeit. Es wur-

den jeweils vier Bestimmungen durchgeführt.

#### <sup>+</sup>Thrombinlösung:

Der Inhalt eines Fläschchens Thrombin wurde in 10 ml Aqua bidest. gelöst, was eine Konzentration von 10 NIH-Einheiten pro ml ergab. Die Lösung wurde in ein Eisbad gestellt und sofort nach der Herstellung verwendet.

### X. Untersuchung der Fibrinpolymerisation

Dieser Test wurde ähnlich wie die Fibrinogenbestimmung von Burmester und Mitarbeitern (70) durchgeführt (siehe Seite 20). 0,5 ml der zu untersuchenden Fibrinogenlösung wurden mit 5,5 ml eines Natriumbarbituratpuffers in einem Reagenzglas gemischt und 3 ml der Mischung in eine 1 cm Quarzküvette überführt. Der Rest wurde in eine gleiche Küvette gebracht und diente als Leerwert. Zur Testlösung wurden 0,015 ml Calcium-Thrombinreagenz pipettiert, sorgfältig unter Vermeidung jeglicher Blasenbildung gemischt und Test- und Leerwertküvette in das Photometer gebracht, wo über eine halbe Stunde jede Minute die Extinktion bei 300 m $\mu$  gemessen wurde. (Reagenzien siehe Seite 23).

### XI. Vernetzbarkeit von Fibrin durch Faktor XIII

Der Test beruht darauf, in der Probe vorhandenen Faktor XIII durch Thrombin, Ca<sup>++</sup> und Cystein (81) zu aktivieren und dadurch Fibrin-s in das harnstoffunlösliche Fibrin-i zu überführen. Verwendet wurde die von Laki und Lorand (82) angegebene Methode. 1 ml der fibrinogenhaltigen Lösung bekannter Konzentration wurde mit 2 ml des auch zur Gerinnungsbestimmung verwendeten Phosphatpuffers (siehe Seite 20) sowie mit 1 ml einer 0,1 M Cysteinlösung, pH 7,0, versetzt und die Mischung mit 0,15 ml CaCl<sub>2</sub>-Thrombinlösung (Inhalt eines Fläschchens Thrombin gelöst in 1 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung vom pH 7,0) zur Gerinnung gebracht. Das Gerinnsel blieb zur Ausbildung der Quervernetzungen 24

Stunden lang bei Raumtemperatur stehen; anschließend wurde wie bei der Gerinungsbestimmung die Synärese durchgeführt und der entstandene Fibrinfil in 10 ml 5 M Harnstofflösung gebracht. Nach 24 Stunden wurden die ungelösten Anteile abzentrifugiert und die Extinktion des Überstandes bei 283 und 320 m $\mu$  gemessen. Aus der Extinktionsdifferenz errechnete sich nach Formel 1' (siehe Seite 19) die Konzentration des gelösten, also nicht an der Quervernetzung beteiligten Materials. Der prozentuale Anteil des gelösten Fibrins am Gesamtfibrinogen ergab sich aus Formel 5:

$$(5) \text{ Anteil des gelösten Materials (\%)} = \frac{\text{Konz. im Überstand}}{\text{Ausgangskonz.}} \cdot 100$$

## XII. Bestimmung des Molekulargewichts und der Sedimentationskonstanten

Diese Untersuchungen wurden in einer Ultrazentrifuge vom Typ Beckman, Modell E, durchgeführt, die mit einer Scanner-Ausrüstung versehen war. Für die Läufe zur Bestimmung der Sedimentationskonstanten wurde eine Doppelsektorzelle verwendet, die Geschwindigkeit betrug 60 000 UpM. Die Gleichgewichtsläufe fanden in einer 6-Kanalzelle bei 5600 UpM statt. Der Scanner war auf eine Wellenlänge von 280 m $\mu$  eingestellt.

Das untersuchte Material war in Citratsaline gelöst; die eingesetzten Konzentrationen betrugen für die Sedimentationsläufe 1 mg/ml, entsprechend einer OD<sub>280</sub> von 0,8, für die Gleichgewichtsläufe 0,5 mg/ml (OD<sub>280</sub> 0,4).

## XIII. Herstellung von hochgereinigtem Rinderfibrinogen (Fraktion I-4)

Das als Vergleichssubstanz bei den meisten Versuchen verwendete Fibrinogen wurde mit Glycin aus Plasma gefällt (47) und nach der Methode von Blombäck und Blombäck (54) bis zur Stufe von Fraktion I-4 gereinigt. Im einzelnen wurde folgendermaßen vorgegangen:

## 1. Isolierung von Fibrinogen aus Rinderplasma

1000 ml Frischplasma wurden im Kryostaten auf 5° abgekühlt und unter vorsichtigem Rühren mit 157,6 g gemahlenem Glycin versetzt, entsprechend einer Konzentration von 2,1 M. Nach zweistündigem Rühren wurde das Präzipitat bei 4° und 1450 g für 15 Minuten abzentrifugiert und in Citratpuffer<sup>+</sup> gelöst. Das so erhaltene Rohfibrinogen wurde der Cohn-Fraktion I gleichgesetzt, wobei jedoch Ausbeute und Gerinnbarkeit bereits wesentlich höher waren (47) als nach der von Cohn beschriebenen Methode (44).

<sup>+</sup>Citratpuffer pH 6,35:

|                            |             |
|----------------------------|-------------|
| Tri-Natriumcitrat-2-Hydrat | 0,055 M     |
| pH                         | 6,35 ± 0,05 |

Der pH-Wert wurde mit konz. HCl eingestellt.

## 2. Reinigung des Fibrinogens nach Blombäck (Abb. 5, Seite 10)

### a) Ausfällung der Fraktion I-1 (kaltunlösliche Globuline)

Die nach 1. erhaltene Fibrinogenlösung wurde mit Citratpuffer pH 6,35 (siehe oben) und mit 1 M Glycin, das im gleichen Citratpuffer gelöst war, soweit verdünnt, daß die entstehende Lösung einen Proteingehalt von 0,67 % und eine Glycinkonzentration von 0,12 M hatte. Zu je 1000 ml der im Kryostaten auf 0° abgekühlten Fibrinogenlösung wurde innerhalb von 45 Minuten unter vorsichtigem Rühren ein ebenfalls auf 0° vorgekühltes Gemisch aus 23,6 ml Äthanol, 21,7 ml 1 M Glycin in Citratpuffer pH 6,35 und 135,7 ml Citratpuffer pH 6,35, zusammen 181 ml, zugetropft. Die Proteinkonzentration betrug nun 0,57 %, die Äthanolkonzentration 2 %, die Molarität an Glycin war 0,12 und die Ionenstärke 0,3. Die Lösung wurde 30 Minuten bei 0° weitergerührt und anschließend der Niederschlag bei 0° und 2000 g 30 Minuten lang abzentrifugiert und verworfen.

### b) Ausfällung der Fraktion I-2 (Fibrinogen)

Je 100 ml des Überstands von Fraktion I-1 wurden tropfenweise mit 37,5 ml auf 0° vorgekühlten Citratpuffers pH 6,35, der 6,94 ml Äthanol enthielt, versetzt, wodurch sich eine Proteinkonzentration von 0,35 %, eine Äthanolkonzentration

von 6,5 %, eine Glycinkonzentration von 0,09 M und eine Ionenstärke von 0,3 ergab. Während der Zugabe wurde die Temperatur der Fibrinogenlösung von 0° auf -4° gesenkt. Es wurde noch eine halbe Stunde bei -4° gerührt und dann der Niederschlag 20 Minuten bei -4° und 2000 g abzentrifugiert.

#### c) Ausfällung der Fraktion I-3 (kaltunlösliche Proteine)

Fraktion I-2 wurde in 0,3 M NaCl gelöst und auf eine Konzentration von etwa 1,8 % gebracht. Zu je 100 ml dieser Lösung wurden tropfenweise 480 ml einer Mischung gegeben, die aus 145 ml wässriger 2 M Glycinlösung, 55 ml Aqua bidest. und 280 ml Phosphatpuffer<sup>+</sup> bestand. Nach dieser Verdünnung lag der pH bei 7,0 - 7,1, die Glycinkonzentration war 0,5 M und die Ionenstärke 0,1. Die Lösung wurde auf 0° abgekühlt. Zu je 100 ml wurden nun 10 ml einer ebenfalls auf 0° vorgekühlten 0,5 M Glycinlösung, die auf 1000 ml 82,5 ml Äthanol enthielt, zugegeben. Das Gemisch wurde bei 0° noch 2 Stunden vorsichtig weitergerührt und anschließend der Niederschlag 20 Minuten lang bei 0° und 2000 g abzentrifugiert und verworfen.

#### d) Ausfällung der Fraktion I-4

Diese Fraktion wurde gefällt bei einer Äthanolkonzentration von 6,5 % und einer Proteinkonzentration von 0,15 %. Der Glycingehalt betrug 0,45 M, der pH etwa 7,0 und die Ionenstärke 0,08. Zu je 1000 ml des auf 0° gekühlten Überstandes von I-3 wurden 123 ml eines 53,3 % igen Äthanol-Wassergemisches unter langsamem Rühren zugetropft. Während der Zugabe wurde die Temperatur von 0° auf -4° herabgesetzt. Das Präzipitat wurde bei -4° und 2000 g eine Viertelstunde lang abzentrifugiert und in Citratsaline pH 7,4 (siehe Seite 18) gelöst. Es bestand aus hochgereinigtem Fibrinogen mit einer Gerinnbarkeit von 96 - 98 %. Zur längeren Aufbewahrung wurde das Material in der Tiefkühltruhe bei -20° eingefroren.

<sup>+</sup>Phosphatpuffer:

|                                        |            |
|----------------------------------------|------------|
| 0,2 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung | 45 ml      |
| 0,2 M $\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Lösung | 155 ml     |
| Aqua bidest.                           | ad 1000 ml |

## D . E R G E B N I S S E

### I. Isolierung der Fibrinogenfraktion I-GS-6

#### 1. Gewinnung und Untersuchung des Ausgangsmaterials

Das Ausgangsmaterial für die hier untersuchte gerinnbare Fraktion I-GS-6 stellte der Überstand dar, der nach Ausfällung des größten Teils des Fibrinogens aus frischem Rinderplasma zurückblieb. Diese Fällung wurde, wie bei Moesson und Sherry (60) angegeben, mit 2,1 M Glycin bei 5° durchgeführt.

Die Messung des Fibrinogengehalts im Überstand ergab eine mittlere Fibrinogenkonzentration von 1 mg/ml und eine Gerinnbarkeit, d.h. einen Anteil von Fibrinogen am Gesamtprotein, von 2,1 %. Das entspricht einem Anteil am gesamten, im Plasma vorhandenen Fibrinogen von 16 % (siehe Tab.3). Dieser Wert liegt wesentlich höher als der Fibrinogenanteil im Glycinüberstand von Humanplasma, der von Moesson zu durchschnittlich 8 % des Gesamtfibrinogens angegeben wurde. Auch der Fibrinogengehalt von Rinderplasma wurde mit 6,5 mg/ml deutlich über dem in Humanplasma von 2 - 4 mg/ml (2, 3, 4) gefunden.

#### 2. Löslichkeit bei verschiedenen Äthanolkonzentrationen und pH-Werten

Als Vorversuche zur Entwicklung eines Fällungsschemas zur Anreicherung bzw. Isolierung der Fraktion I-GS wurde die Löslichkeit des gerinnbaren Materials im Überstand der Glycinfällung bei verschiedenen Äthanolkonzentrationen und unterschiedlichen pH-Werten studiert.

Cohn und Mitarbeiter (44) hatten in ihren Experimenten zur Isolierung verschiedener Plasmaproteine festgestellt, daß bei einer Äthanolkonzentration von 24 % kein Fibrinogen mehr in Lösung vorlag. Dagegen fanden sich bei einer Äthanolkonzentration von 8 %, wie sie zur Ausfällung von Fraktion I dient, die in der Hauptsache aus Fibrinogen besteht, nur etwa 60 % des Fibrinogens im Nie-

Tab. 3. Fibrinogengehalt und Gerinnbarkeit von Plasma und Glycinüberstand. Angegeben sind Mittelwerte, Variationsbreiten in Klammern. Die Plasmawerte sind korrigiert für Verdünnung mit Auffangpuffer; die Überstandswerte sind korrigiert für Verdünnung mit Auffangpuffer und Glycin.

|                               | Fibrinogen-<br>gehalt<br>(mg/ml) | Anteil am<br>Gesamtprotein<br>=Gerinnbarkeit (%) | Anteil am<br>Gesamt-<br>fibrinogen (%) |
|-------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------------------|----------------------------------------|
| Plasma<br>(10 Plasmen)        | 6,5<br>(4,9 - 8,5)               | 11,3<br>(8,3 - 17,0)                             | 100                                    |
| Überstand<br>(aus 17 Plasmen) | 1,0<br>(0,7 - 1,4)               | 2,1<br>(1,5 - 2,8)                               | 16,0<br>(12,1 - 19,8)                  |

derschlag. Der Rest blieb in Lösung. Der pH-Wert bei diesen Versuchen war 7,5 und die Ionenstärke 0,3. Das Löslichkeitsverhalten des Fibrinogens gegenüber Äthanol erwies sich als weitgehend unabhängig von der Fibrinogenkonzentration (45).

Bei meinen Untersuchungen wurde der gegen Citratpuffer pH 7,2,  $\mu$ 0,15 (siehe Seite 17) dialysierte, glycinfreie Überstand mit der gleichen Menge Fällungsreagens versetzt, das zur einen Hälfte aus der entsprechenden Menge Äthanol und Wasser, zur anderen aus Phosphatpuffer pH 7,2 bestand und einen pH von 7,2 sowie eine Ionenstärke von 0,15 hatte. Fällung bei pH 7,2, Ionenstärke 0,15, Temperatur  $-4^{\circ}$ . Die Ergebnisse zeigt Tab. 4.

Bei einer Äthanolkonzentration von 15 % oder mehr wurde praktisch das gesamte gerinnbare Material ausgefällt. Die nicht gerinnbaren Anteile im Niederschlag nahmen mit fallender Äthanolkonzentration ab, wie die ansteigende Gerinnbarkeit des Präzipitats bewies. Für eine optimale Ausbeute zusammen mit guter Gerinnbarkeit wurde daher eine Äthanolkonzentration von 15 % verwendet.

Tab. 4. Niederschläge gefällt aus dialysiertem Überstand mit Phosphatpuffer-Äthanolgemischen; pH 7,2, 0,15, T -4°.

| Äthanol<br>(%) | % des Fibrinogens<br>im Niederschlag | Gerinnbarkeit im<br>Niederschlag (%) |
|----------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 24             | 93                                   | 3,9                                  |
| 21             | 95                                   | 4,7                                  |
| 18             | 95                                   | 5,4                                  |
| 15             | 98                                   | 7,3                                  |
| 12             | 86                                   | 15,0                                 |
| 9              | 66                                   | 15,0                                 |

Den Einfluß des pH-Wertes auf die Fällung zeigt Tab. 5. Es wurden pH 7,2 gewählt, was etwa dem physiologischen pH des Plasmas nahekommt, und pH 5,8, nachdem sich der isoelektrische Punkt des Fibrinogens zwischen 5,5 und 5,8 befindet (83).

Bei gleichen Äthanolkonzentrationen fand sich im Niederschlag bei pH 5,8 stets eine niedrigere Gerinnbarkeit als bei pH 7,2; dagegen war die ausgefällte Fibrinogenmenge bei pH 5,8 etwas größer (bei Äthanolkonzentrationen von 12 bzw. 9 %). Das läßt auf eine nicht gerinnbare Plasmakomponente schließen, die ihr Löslichkeitsminimum ebenfalls im Bereich von pH 5,8 hat, bei pH 7,2 aber besser löslich ist als Fibrinogen. Deshalb erscheint für Äthanolpräzipitationen ein pH von 7,2 - 7,4 günstiger.

Bei Verwendung von Ammoniumsulfatlösungen zur Fällung ließ sich ein derartiger Einfluß des pH-Wertes nicht feststellen. Diese Fällungen wurden daher stets bei einem pH-Wert von 5,4 vorgenommen.

Tab. 5. Niederschläge gefällt aus dialysiertem Überstand mit Phosphatpuffer-Äthanolgemischen bei verschiedenen pH-Werten; 0,15, T -4°.

| Äthanol <sup>+</sup><br>(%) | pH  | % des Fibrinogens<br>im Niederschlag | Gerinnbarkeit im<br>Niederschlag (%) |
|-----------------------------|-----|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 15                          | 7,2 | 98                                   | 7,3                                  |
| 15                          | 5,8 | 98                                   | 6,3                                  |
| 12                          | 7,2 | 94                                   | 11,6                                 |
| 12                          | 5,8 | 99                                   | 8,2                                  |
| 9                           | 7,2 | 66                                   | 15,0                                 |
| 9                           | 5,8 | 71                                   | 13,8                                 |

<sup>+</sup> Lösungen gleicher Äthanolkonzentration entstammen der gleichen Plasmaprobe.

### 3. Löslichkeit in Glycine-lösungen

Fibrinogenhaltiges Material, das aus dem dialysierten Überstand der ersten Glycine-fällung (siehe I.1) angereichert worden war, wurde auf seine Löslichkeit in Anwesenheit von 2,1 M Glycine bei 5° untersucht. Unter diesen Bedingungen wurden aus Plasma bei einer physiologischen Fibrinogenkonzentration von 7,0 mg/ml durchschnittlich 85 % des vorhandenen Fibrinogens ausgefällt, während aus einer Lösung von I-4 praktisch das gesamte Protein präzipitiert wurde. Bei der Untersuchung einer Lösung des Rohfibrinogens, das durch zweimaliges Fällen des Überstandes mit je 15 % Äthanol bei pH 7,2 und -4° angereichert worden war und eine Fibrinogenkonzentration von 7,0 mg/ml bei einer Gerinnbarkeit von 31 % aufwies, fanden sich nach der Glycine-fällung nur 39 % des gerinnbaren Materials im Niederschlag, während 61 % in Lösung blieben (Tab. 6).

Die Tatsache, daß Fraktion I-GS überhaupt präzipitiert wird - sie ist ja dadurch definiert, daß sie bei der Glycine-fällung aus dem Plasma in Lösung

Tab. 6. Der Effekt von 2,1 M Glycin bei 5° auf verschiedene Fibrinogenfraktionen gleicher Konzentration

|                            | Fibrinogenkonz.<br>(mg/ml) | Gerinnbarkeit<br>(%) | % des Fibrinogens<br>im Niederschlag |
|----------------------------|----------------------------|----------------------|--------------------------------------|
| Plasma                     | 7,0                        | 11                   | 85                                   |
| Fraktion I-4 <sup>+</sup>  | 7,0                        | 97                   | 98                                   |
| Fraktion I-GS <sup>+</sup> | 7,0                        | 31                   | 39                                   |

<sup>+</sup> gelöst in Citratsaline pH 7,4

bleibt - ist der erhöhten Konzentration zuzuschreiben. In der hier untersuchten angereicherten Lösung lag das I-GS-Fibrinogen in einer Konzentration von 7,0 mg/ml vor, während es im Plasma nur in etwa 1 mg/ml vorhanden ist.

#### 4. Reinigung von Fraktion I-GS

Die Isolierung und Reinigung von Fraktion I-GS wurde in sechs Schritten durchgeführt. Das bei den einzelnen Schritten anfallende Material von steigendem Reinheitsgrad wurde mit I-GS-1 bis I-GS-6 bezeichnet.

Ausgangsmaterial war, wie schon erwähnt, der Überstand der ersten Glycinfällung aus dem Plasma. Dieser Überstand war mit Glycin gesättigt, was weitere Fällungen sehr erschwerte. So erhielt man bei Äthanol-fällungen, die durch Zutropfen eines Äthanol-Puffergemisches im Verhältnis 1 : 1 durchgeführt wurden, bei einer Konzentration von 15 % Äthanol nur eine Ausbeute von 35 %. Ähnlich war das Ergebnis bei Zugabe einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung bis zu 28,6 % Sättigung. Bei Fällungen mit Äthanol in einer Konzentration über 15 % fiel ein großer Teil des Glycins mit aus.

Der erste Schritt der Aufarbeitung diente deshalb vorwiegend der Entfernung

des Glycins. Dies gelang durch Fällung von Fibrinogen mit 25 % Äthanol, nachdem die Ausgangslösung mit Wasser stärker verdünnt worden war. Ein Volumen des Überstandes wurde mit Wasser im Verhältnis 1 : 1 versetzt und zu dieser Mischung die gleiche Menge eines 50 % igen Äthanol-Wassergemisches getropft. Unter diesen Bedingungen blieb das Glycin vollständig in Lösung, während die Fibrinogenausbeute im Niederschlag nahezu 100 % war. Dieses Verfahren wurde einer Dialyse gegen eine Lösung von NaCl, Citrat und  $\epsilon$ -Aminocapronsäure vorgezogen. Die Dialyse gestaltete sich bei der Verarbeitung grösserer Mengen sehr umständlich, beanspruchte lange Zeit - für eine praktisch vollständige Entfernung des Glycins waren drei Dialysebäder zu je 12 Stunden notwendig - und führte vor allem zu einem nicht unerheblichen Fibrinogenverlust. Dieser betrug in einzelnen Fällen bis zu 20 % und wurde wahrscheinlich durch proteolytische oder fibrinolytische Aktivitäten im Ausgangsmaterial hervorgerufen, die durch  $\epsilon$ -Aminocapronsäure bzw.  $\text{Ca}^{++}$ -Entzug mittels Citrat nicht gehemmt wurden.

Im einzelnen wurde die Anreicherung folgendermaßen durchgeführt (siehe dazu Abb. 8; Ausbeute und Gerinnbarkeit bei den einzelnen Reinigungsschritten zeigt Tab. 7):

a) Fällung mit Äthanol bei einer Konzentration von 25 %, einem pH von 7,2, einer Ionenstärke von 0,04 und einer Temperatur von  $-5^{\circ}$ :

Dazu wurde der Überstand mit Wasser auf die doppelte Menge gebracht und im Kryostaten abgekühlt. Unter ständigem Rühren wurde die gleiche Menge eines vorgekühlten 50 % igen Äthanol-Wassergemisches zugegeben, wobei die Temperatur stets unter  $0^{\circ}$  gehalten wurde. Die Fällungsdauer betrug nach Zugabe des Äthanol 30 Minuten. Das Präzipitat wurde mit 1450 g 30 Minuten lang abzentrifugiert, in Citratsaline gelöst und auf das Ausgangsvolumen des Überstandes gebracht (Fraktion I-GS-1).

Die Bedeutung dieses Schrittes lag, wie oben ausgeführt, in der Entfernung des Glycins; gleichzeitig kam es aber auch zur Abtrennung von etwa 2/3 aller Plasmaproteine, hauptsächlich der Albumine, die ebenfalls in Lösung blieben. Das Präzipitat entsprach auf Grund der Fällungsbedingungen der Fraktion II + III nach Cohn (44), die neben dem Restfibrinogen den größten Teil der  $\beta$ -Globuline und nahezu die gesamten  $\gamma$ -Globuline enthält.

b) Fällung mit Äthanol bei einer Konzentration von 15 %, einem pH von 7,2, einer Ionenstärke von 0,08 und einer Temperatur von  $-5^{\circ}$ :

Fraktion I-GS-1 wurde im Kryostaten vorgekühlt und mit der gleichen Menge eines ebenfalls vorgekühlten 30 % igen Äthanol-Wassergemisches versetzt, wobei weiter wie unter a) verfahren wurde. Das abzentrifugierte Präzipitat wurde wieder in Citratsaline gelöst und auf die halbe Ausgangsmenge gebracht (Fraktion I-GS-2).

Die bei den beiden Äthanolfällungen erzielte Ausbeute lag im Durchschnitt bei 92 %, bei einer Steigerung der Gerinnbarkeit von etwa 2 auf 8 %.

c) 1. Fällung mit Ammoniumsulfat bei 28,6 % iger Sättigung, pH 5,4 und einer Temperatur von  $+4^{\circ}$ :

Fraktion I-GS-2 wurde mit Citratpuffer pH 4,0 (56 ml 0,1 M Na-Citrat und 44 ml 0,1 M HCl nach (84)) auf pH 5,4 gebracht und im Kryostaten auf  $4^{\circ}$  abgekühlt. Unter Rühren wurden pro 100 ml Proteinelösung 40 ml einer bei  $4^{\circ}$  gesättigten Ammoniumsulfatlösung zugetropft, entsprechend einer 28,6 % iger Sättigung. Die Fällungsdauer betrug 30 Minuten. Das Präzipitat wurde mit 8000 g für 20 Minuten abzentrifugiert, in Citratsaline gelöst und auf 1/4 der Ausgangsmenge gebracht (Fraktion I-GS-3).

d) 2. Fällung mit Ammoniumsulfat unter den gleichen Bedingungen wie bei c), lediglich bei höherer Proteinkonzentration.

Das Präzipitat wurde in Citratsaline gelöst und auf eine Fibrinogenkonzentration von 8 mg/ml gebracht, entsprechend 1/10 bis 1/15 der Ausgangsmenge (Fraktion I-GS-4).

Die beiden Ammoniumsulfatfällungen brachten bei einer Ausbeute von durchschnittlich 73 % eine Steigerung der Gerinnbarkeit auf 53 %, entsprechend einer Anreicherung um das 25-fache.

e) Fällung mit  $\beta$ -Alanin bei einer Konzentration von 2,5 M,  $0^{\circ}$  und einer Fibrinogenkonzentration von 4 mg/ml:

Die Fällung erfolgte nach den Angaben von Straughn und Wagner (48). Im Gegensatz zu der dort angegebenen Konzentration von 2 M  $\beta$ -Alanin wurde die Fällung mit 2,5 M vorgenommen, da die Ausbeute bei 2 M unbefriedigend war. Anders als mit Äthanol oder Ammoniumsulfat zeigten Fällungen mit  $\beta$ -Alanin eine deutliche

Abhängigkeit von der Proteinkonzentration, weshalb hier stets bei einer Fibrinogenkonzentration von 4 mg/ml gefällt wurde. Zur Fraktion I-GS-4, mit einer Fibrinogenkonzentration von 8 mg/ml und auf 0° abgekühlt, wurde unter Rühren das gleiche Volumen einer 5 M  $\beta$ -Alaninlösung zugetropft. Die Fällungsdauer betrug wieder 30 Minuten. Um ein möglichst dicht gepacktes Präzipitat zu erhalten, wurde bei diesem letzten Fällungsschritt mit 10 000 g für 30 Minuten zentrifugiert. Das Präzipitat wurde mit Citratsaline auf 1/20 der Ausgangsmenge gebracht (Fraktion I-GS-5).

#### f) Gelfiltration als letzter Reinigungsschritt:

Bei den unter II.1. näher erläuterten Versuchen mit verschiedenen Sepharose- bzw. Agarosegelen (Sephadex G-200, Bio-Gel A-15 und Bio-Gel A-5) hatte sich der beste Reinigungseffekt bei Bio-Gel A-5 ergeben. Dieses Gel wurde daher für den letzten Reinigungsschritt verwendet. 4 - 8 ml der Fraktion I-GS-5 mit einer Konzentration von 6 - 10 mg/ml wurden auf eine Säule von 2,5 x 86 cm aufgetragen und mit einer Geschwindigkeit von 7,1 ml/h mit Citratsaline eluiert. Das Eluat wurde in Fraktionen von 3,55 ml aufgefangen. In allen proteinhaltigen Fraktionen wurde zunächst ein qualitativer Fibrinogentest durchgeführt und anschließend die fibrinogenhaltigen Lösungen mit der modifizierten Methode nach Burmester (siehe Seite 20) auf ihre Fibrinogenkonzentration untersucht. Die Fraktionen des Fibrinogengipfels wurden gesammelt und durch Fällung mit Ammoniumsulfat bei 50 % iger Sättigung und Auflösen des Präzipitats in Citratsaline eingeeengt. Durch diesen letzten Schritt konnte eine durchschnittliche Steigerung der Gerinnbarkeit um 7 % erzielt werden; außerdem konnte das Vorhandensein von Verunreinigungen mit wesentlich höherem oder niedrigerem Molekulargewicht als Fibrinogen damit ausgeschlossen werden.

Die so erhaltene Fraktion I-GS-6 wies eine Gerinnbarkeit von 73 - 80 % auf, was einer 35 - 40 fachen Anreicherung entsprach; die Gesamtausbeute lag im Mittel bei 50 %.

#### 5. Weitere Reinigungsversuche mittels trägerfreier Elektrophorese

Die den bisherigen Reinigungsschritten zugrundeliegenden Kriterien für die Abtrennung von Verunreinigungen waren die unterschiedliche Löslichkeit von Fibrinogen und Fremdproteinen in Medien, die Äthanol, Salze oder Aminosäuren

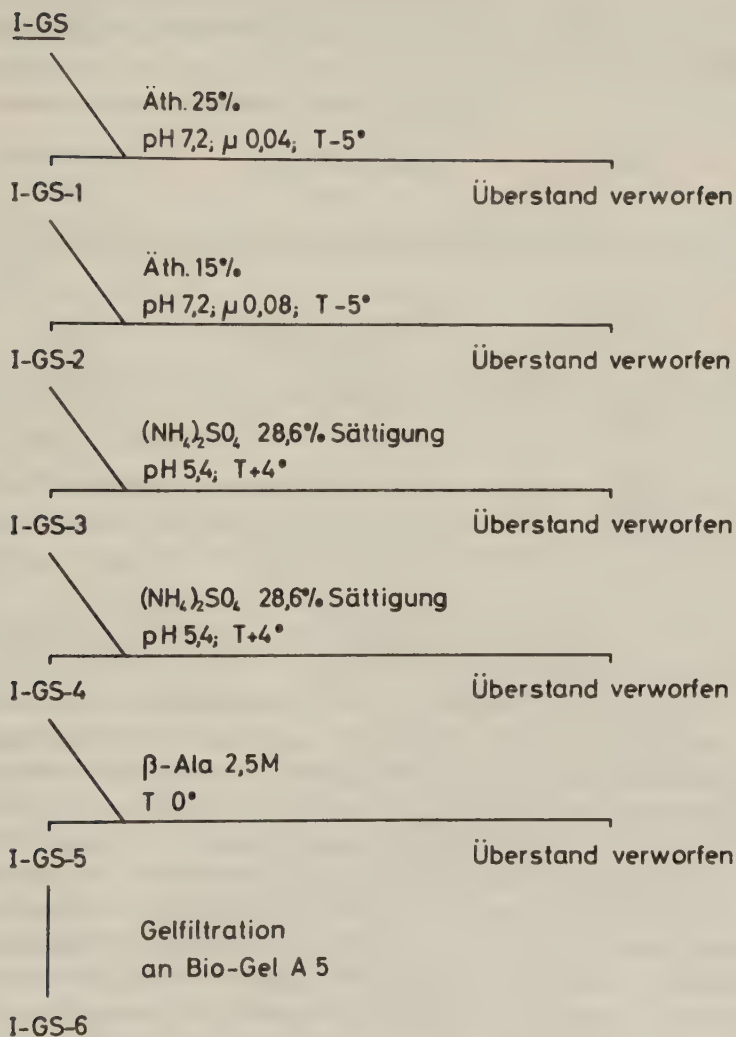


Abb. 8. Reinigung der Fraktion I-GS

Tab. 7. Reinigung der Fraktion I-GS, Ausbeute und Gerinnbarkeit bei den einzelnen Reinigungsschritten. Angegeben sind Mittelwerte, Variationsbreiten in Klammern.

| Fraktion | Gesamtausbeute<br>(%) | Gerinnbarkeit<br>(%) |
|----------|-----------------------|----------------------|
| I-GS     | 100                   | 2,1 (1,5 - 2,8)      |
| I-GS-1   | 98 (92 - 100)         | 6,4 (5,3 - 7,8)      |
| I-GS-2   | 92 (85 - 98)          | 7,9 (6,7 - 9,1)      |
| I-GS-3   | 77 (55 - 96)          | 37 ( 32 - 42 )       |
| I-GS-4   | 73 (53 - 92)          | 53 ( 45 - 67 )       |
| I-GS-5   | 57 (32 - 76)          | 71 ( 62 - 75 )       |
| I-GS-6   | 50 (25 - 63)          | 78 ( 73 - 80 )       |

enthielten, sowie die Differenzen in Molekulargewicht und Form des Moleküls. Für eine weitere Reinigung wurde daher versucht, eventuell bestehende Ladungsverschiedenheiten auszunutzen. Dafür wurde die trägerfreie Elektrophorese gewählt, in einer Methode, wie sie für die Aufarbeitung von Fibrinogen von van der Bosch (53, 74) angegeben wurde. Die Elektrophorese der Fraktion I-GS-6 ergab jedoch keine Steigerung der Gerinnbarkeit. Das Material verhielt sich vollkommen einheitlich. Bei Elektrophoresen von Fraktion I-GS-5 war die Auftrennung schlechter als bei der Gelfiltration. Diese Versuche wurden deshalb wieder aufgegeben, nicht zuletzt da das Material in Puffern mit der für die trägerfreie Elektrophorese notwendigen geringen Ionenstärke nicht in Lösung zu halten war und die Lösungen auch durch Zugabe von Saccharose, wie von van der Bosch für Fibrinogen angegeben, nur ungenügend stabilisiert wurden.

Überhaupt erwies sich die Fraktion I-GS auf allen Reinigungsstufen als ziemlich instabil: bei längerem Stehen (Tage) bei Raumtemperatur, aber ebenso

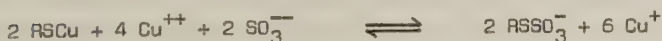
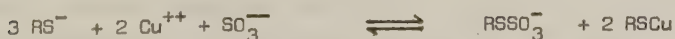
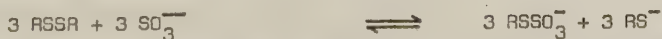
auch im Kühlraum bei  $+6^{\circ}$ , nahm die Gerinnbarkeit bis zu 10 % ab; teilweise kam es auch zum Ausfallen von Material. Die beste Aufbewahrungsart war sofortiges Einfrieren und Lagerung bei  $-20^{\circ}$ ; auch dabei ließen sich jedoch geringe Fibrinogenverluste nicht immer vermeiden.

## II. Untersuchung der chemischen und biologischen Eigenschaften von Fraktion I-GS

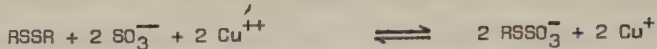
Mit dem Gesamtmolekül, also dem nicht in seine Ketten gespaltenen, biologisch aktiven Fibrinogenmolekül der Fraktion I-GS-5 bzw. I-GS-6 wurden folgende Versuche durchgeführt:

Gelfiltration an verschiedenen Gelen, Diskelektrophorese, Bestimmung der Sedimentationskonstanten und des Molekulargewichts in der Ultrazentrifuge, Bestimmung der Thrombinzeit, Fibrinpolymerisationstest und der Test auf Faktor XIII.

Für weitere Experimente wurde das Fibrinogen der Fraktion I-GS-6 durch Spaltung der intramolekularen Disulfidbrücken in seine Einzelketten zerlegt. Dafür stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung: die Disulfidbrücken können oxidativ mit Hilfe von Perameisensäure oder reduktiv mittels Natriumborhydrid, Mercaptoessigsäure, Mercaptoethanol oder Natriumsulfit gespalten werden. Für Fibrinogen wird eine von Swan (85) sowie von Pechère und Mitarbeitern (86) beschriebene Methode, die von Henschen (75) modifiziert wurde, häufig verwendet. Bei dieser Reaktion werden die Disulfidbrücken zwischen zwei Cysteinresten durch Sulfit und Kupfer-II-Ionen nach folgendem Schema gespalten. Unter der Wirkung des Sulfits zerfällt zunächst jede Disulfidgruppierung in eine Sulfhydrylgruppe und eine S-Sulfogruppe. Die ziemlich reaktiven Sulfhydrylgruppen werden dann durch  $\text{Cu}^{++}$  und Sulfit über mehrere Zwischenstufen ebenfalls in S-Sulfogruppen überführt:



Als Summe dieser Einzelreaktionen erhält man:



Die Spaltung der Disulfidgruppen von Fibrinogen gelingt nur, wenn man die Tertiärstruktur des Proteins mit denaturierenden Agentien, z.B. 8 M Harnstoff, auflockert.

Nach dieser Methode wurden Fibrinogen und Fibrin der Fraktion I-GS-6 in Einzelketten gespalten und mit Hilfe der Diskelektrophorese und der Ionenaustauschchromatographie an CM-Cellulose untersucht. Dabei dienten die S-Sulfo-derivate aus I-4-Fibrinogen bzw. -Fibrin als Vergleichssubstanzen. Anhand dieser Versuche konnten die Einzelketten näher charakterisiert und Aussagen über den Aufbau des Moleküls aus seinen Ketten gemacht werden.

## 1. Gelfiltration an Sepharose und Agarose

Das Prinzip der Gelfiltration beruht auf einem Molekularsiebeffekt, bei dem die verschiedenen Moleküle nach ihrer Größe getrennt werden. Verwendet werden Gele, die unlösliche, poröse Granula aus Polysacchariden wie Sepharose oder Agarose oder aus Polyacrylamid enthalten. Die Porengröße der Granula ist durch den Vernetzungsgrad des Materials genau definiert. Alle Moleküle, die klein genug sind, um in diese Poren eindringen zu können, werden dadurch bei ihrer Wanderung durch das Gel zurückgehalten, und zwar umso stärker, je kleiner sie sind, bis sie durch das nachströmende Elutionsmittel schließlich verdrängt werden. Die Moleküle dagegen, deren Größe die der Poren übertrifft, können sich nur im Raum außerhalb der Granula verteilen und wandern deshalb am schnellsten durch die Säule. Das Flüssigkeitsvolumen zwischen den Granula wird als Leervolumen bezeichnet, das Volumen, das bis zum Erscheinen einer Substanz durch die Säule läuft, ist das Elutionsvolumen. Das Verhältnis von Elutionsvolumen zu Leervolumen stellt einen charakteristischen Wert für eine bestimmte Substanz dar. Sein Logarithmus ist in den meisten Fällen, so z.B. bei globulären Proteinen, umgekehrt proportional dem Molekulargewicht der Substanz.

Zur Gelfiltration von Fraktion I-GS wurden Versuche an Sephadex G-200, Bio-Gel A-15 und Bio-Gel A-5 mit Material verschiedenen Reinheitsgrades unternommen, mit dem Ziel einer weiteren Reinigung sowie einer näheren Charakterisie-

rung im Vergleich mit I-4. Dabei zeigte sich, daß Fibrinogen an Sepharose und Agarose ganz anders als globuläre Proteine ähnlicher Größe wanderte. Die Ursache dafür dürfte wahrscheinlich in der ungewöhnlichen, langgestreckten Form des Moleküls liegen, das nach den Untersuchungen von Hall und Slayter (17) bei einer Länge von 450 Å einen Durchmesser von 50 - 60 Å hat, und deshalb nicht in gleichem Maß wie globuläre Proteine in die Poren des Gels einzudringen vermag.

Auf Sephadex G-200, dessen Ausschlußgrenze für globuläre Proteine nach Angaben des Herstellers bei einem Molekulargewicht von 800 000 liegt, wanderte das Fibrinogen mit dem Leervolumen; es fand sich kein Unterschied zwischen dem gerinnbaren Material der Fraktion I-GS-5 und I-4 (Abb. 9 und 10). Von Fraktion I-GS-5 konnten zwei langsamer wandernde, nicht gerinnbare Komponenten abgetrennt werden. Die Gerinnbarkeit stieg dadurch um etwa 5 %.

Für Bio-Gel A-15 wird eine Molekulargewichtsausschlußgrenze von 15 Millionen angegeben. Das Chromatogramm sowohl von I-4 als auch von I-GS zeigten auf diesem Gel einen konstanten Vorgipfel, der mit dem Leervolumen wanderte. Dieses Material war nicht gerinnbar. Das Trennbild von Fraktion I-GS-4 wies neben dem Vorgipfel und dem das gesamte gerinnbare Material enthaltenden Hauptgipfel eine Schulter und eine schwache dritte Fraktion auf. Beides war im Trennbild von Fraktion I-GS-5, also nach der Fällung mit  $\beta$ -Alanin, nicht mehr vorhanden (Abb. 11, 12 und 13). Dabei ergab sich eine Steigerung der Gerinnbarkeit um 3 - 5 %.

Wie oben erwähnt, kann man aus dem Verhältnis von Elutionsvolumen zu Leervolumen überschlagsmäßig das Molekulargewicht eines globulären Proteins bestimmen (87). Für I-4 und den gerinnbaren Anteil von I-GS ergab sich ein Verhältnis von etwa 1,5, wobei ein Leervolumen von 38 % des Säulenvolumens zugrundegelegt wurde (88). Dieser Wert entspricht einem Molekulargewicht von 1 - 2 Millionen, d.h. Fibrinogen verhält sich auf Bio-Gel A-15 wie ein globuläres Protein dieses Molekulargewichts.

Auch auf Bio-Gel A-5, mit einer Ausschlußgrenze von 5 Millionen, fanden sich in den Trennbildern von I-4 und I-GS Vorfraktionen, die hier aber nicht identisch waren; während die Vorfraktion von I-GS im Leervolumen erschien, wanderte die von I-4 langsamer. Es handelte sich also um verschiedenes Material. Beide Vorfraktionen erwiesen sich als ungerinnbar und wurden nicht näher untersucht. Fraktion I-GS-4 zeigte im Gelchromatogramm eine Schulter vor dem

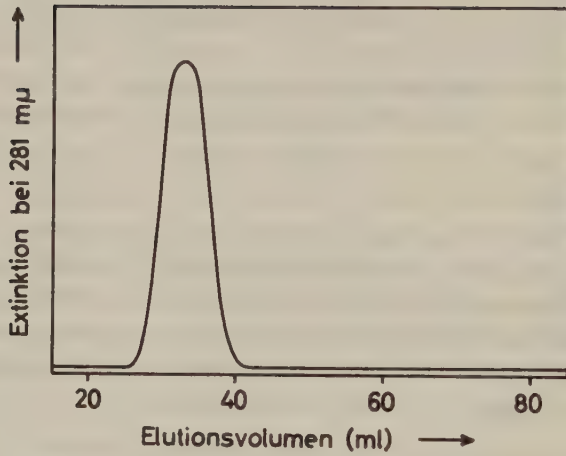


Abb. 9. Gelfiltration an Sephadex G-200: Fraktion I-4

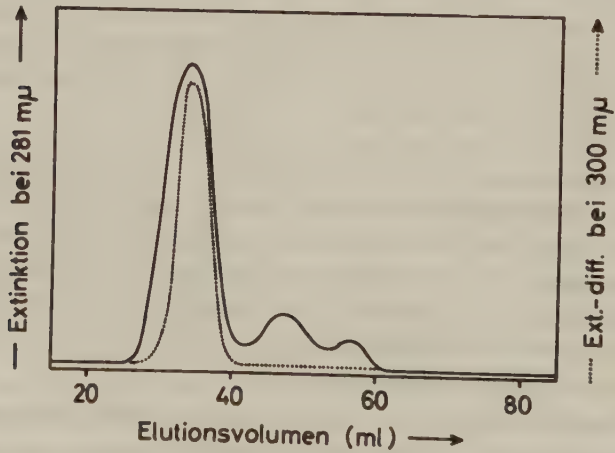


Abb. 10. Gelfiltration an Sephadex G-200: Fraktion I-GS-5 (ausgezogen)  
Punktiert: gerinnbarer Anteil von I-GS-5, gemessen anhand der Extinktionsdifferenz vor und 15 Minuten nach Zugabe von Thrombin bei 300 mμ, nach der modifizierten Methode von Burmester (70) (siehe Seite 20).

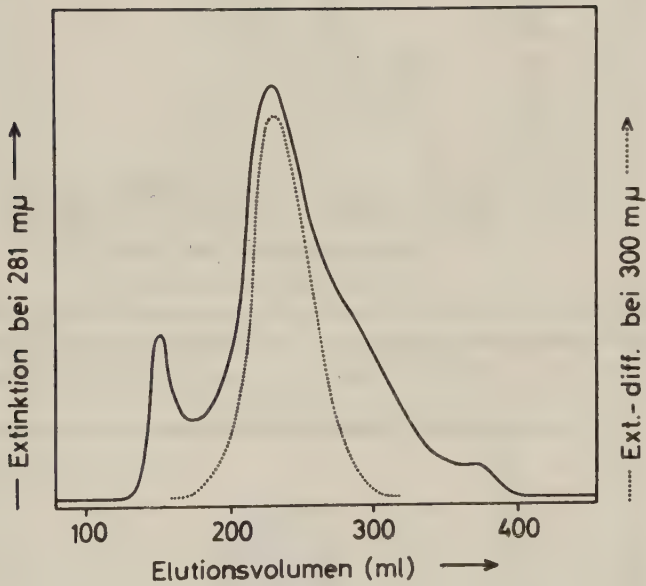


Abb. 11. Gelfiltration an Bio-Gel A-15: Fraktion I-GS-4 (ausgezogen)  
Punktiert: gerinnbarer Anteil von I-GS-4 (siehe Legende zu Abb. 10)

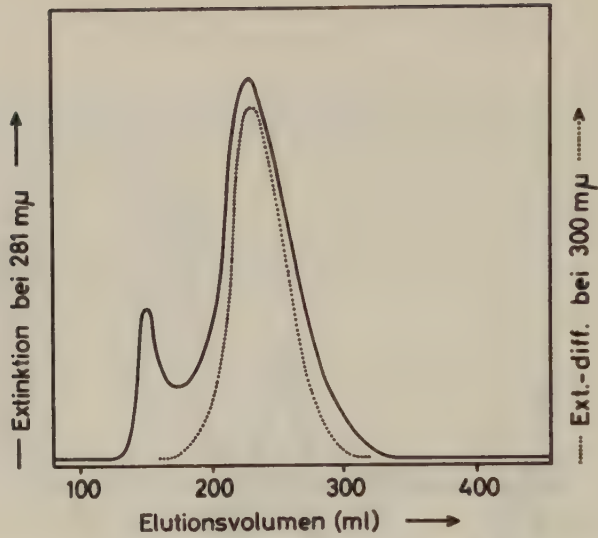


Abb. 12. Gelfiltration an Bio-Gel A-15: Fraktion I-GS-5 (ausgezogen)  
Punktiert: gerinnbarer Anteil von I-GS-5 (siehe Legende zu Abb. 10)

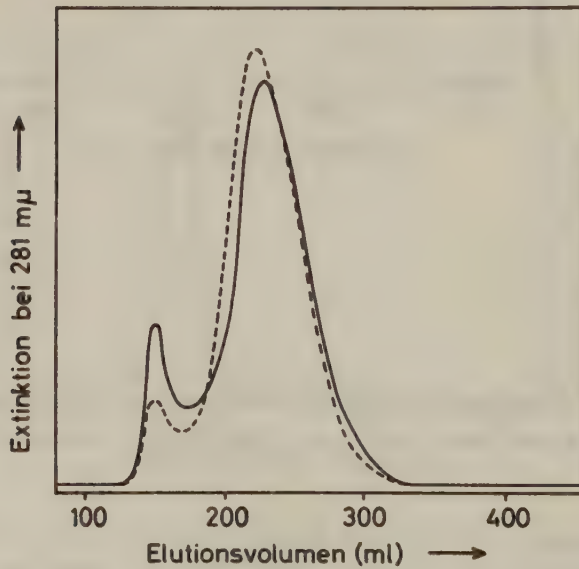


Abb. 13. Gelfiltration an Bio-Gel A-15: Fraktion I-GS-5 (ausgezogen)  
im Vergleich mit Fraktion I-4 (gestrichelt)

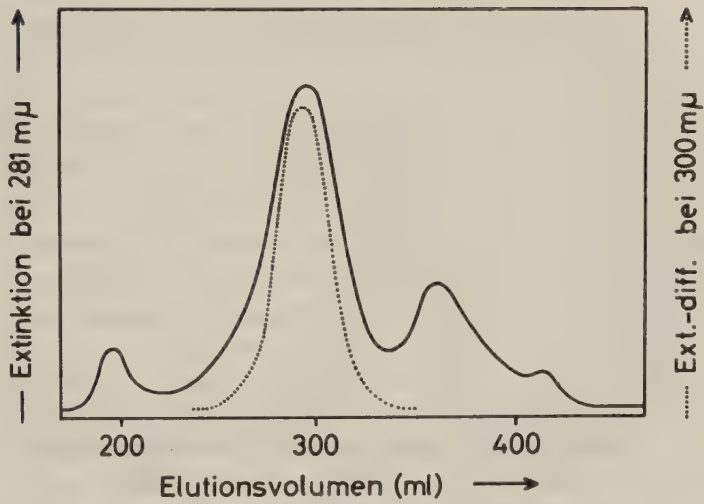


Abb. 14. Gelfiltration an Bio-Gel A-5: Fraktion I-GS-4 (ausgezogen)  
Punktiert: gerinnbarer Anteil von I-GS-4 (siehe Legende zu Abb. 10)

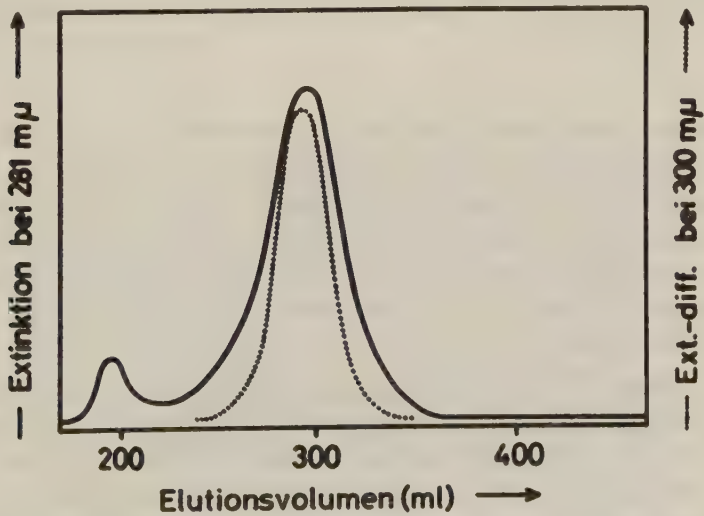


Abb. 15. Gelfiltration an Bio-Gel A-5: Fraktion I-GS-5 (ausgezogen)  
Punktiert: gerinnbarer Anteil von I-GS-5 (siehe Legende zu Abb. 10)

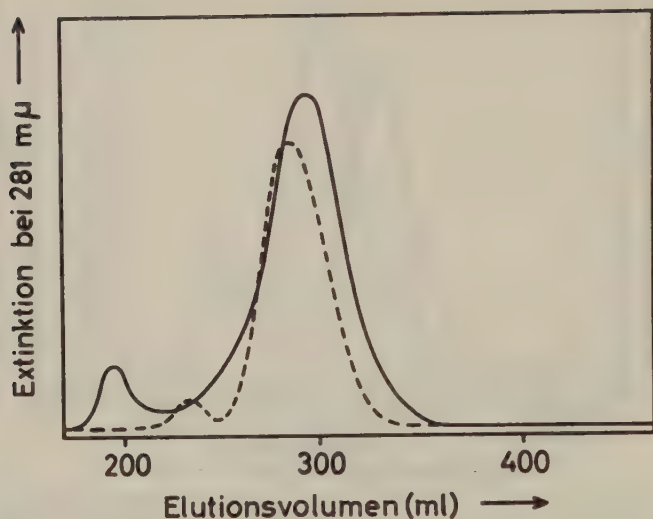


Abb. 16. Gelfiltration an Bio-Gel A-5: Fraktion I-GS-5 (ausgezogen) im Vergleich mit Fraktion I-4 (gestrichelt)

Hauptgipfel sowie einen dritten und einen schwachen vierten Gipfel, die beide nach der Fällung mit  $\beta$ -Alanin verschwunden waren (Abb. 14, 15 und 16).

Auf Bio-Gel A-5 war die Auftrennung am besten und die Steigerung der Gerinnbarkeit lag mit 6 - 10 % höher als bei den anderen Gelen. Das Fibrinogen verhielt sich hier ähnlich wie ein globuläres Protein gleichen Molekulargewichts und zeigte ein Verhältnis von Elutionsvolumen zu Leervolumen von 1,8, was einem Molekulargewicht von 2 - 300 000 entspricht (88).

Sowohl auf Bio-Gel A-15 als auch auf A-5 wies die Fraktion I-GS stets eine etwas geringere Wanderungsgeschwindigkeit auf als I-4. So war bei Verwendung von Bio-Gel A-5 das Verhältnis von Elutionsvolumen zu Leervolumen bei I-4 1,77, gegenüber einem Wert von 1,84 bei I-GS. Dies könnte auf ein etwas geringeres Molekulargewicht von I-GS oder auf eine im Vergleich zu I-4 etwas veränderte Konformation, die ein leichteres Eindringen in die Poren des Gels gestattet, hinweisen.

## 2. Diskelektrophorese des Gesamtmaterials

Die Diskelektrophorese wird auf Polyacrylamidgel durchgeführt; dabei wird das aufgetragene Material zunächst in einem niedrigprozentigen Sammelgel konzentriert, um dann im höherprozentigen Trenngel auf Grund von Ladungs- und Molekulargewichtsdifferenzen der einzelnen Komponenten aufgetrennt zu werden.

Wegen des hohen Molekulargewichts von Fibrinogen war die Wanderungsgeschwindigkeit in den üblichen, 7,5 % igen Gelen sehr gering, sodaß Unterschiede zwischen verschiedenen Fibrinogenfraktionen nicht festgestellt werden konnten. Verwendet wurden daher 4 % ige Gele, die allerdings den Nachteil hatten, daß die entstehenden Banden vor allem bei längeren Laufzeiten ziemlich breit und meist etwas verwaschen waren; die Unterschiede zwischen I-GS und I-4 waren aber eindeutig. Bei einer Stromstärke von 3 mA/Gel und einer Laufzeit von 4 bzw. 6 Stunden zeigte I-GS-6 eine deutlich höhere Wanderungsgeschwindigkeit, außerdem war die Bande, bei gleicher Fibrinogenkonzentration, etwas breiter als die von I-4 (Abb. 17).

Von verschiedenen Präparationen der Fraktion I-GS-6 erwiesen sich einige nach diskelektrophoretischen Kriterien als rein, einige zeigten noch ein bis zwei schwache Nebekomponenten.

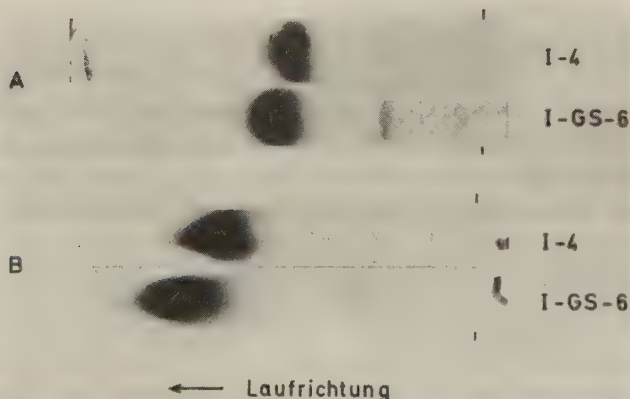


Abb. 17. Diskelektrophorese von Fibrinogen der Fraktion I-4 und der Fraktion I-GS-6. A: Laufzeit 4 h; B: Laufzeit 6 h.

### 3. Bestimmung des Molekulargewichts und der Sedimentationskonstanten in der Ultrazentrifuge<sup>+</sup>

Es gibt mehrere Methoden, Molekulargewichte hochmolekularer Substanzen mit der Ultrazentrifuge zu bestimmen; die gebräuchlichsten sind Sedimentations- und Diffusionsmessungen und vor allem der Gleichgewichtslauf (83). Im Sedimentationslauf werden die Proteinlösungen in der rasch umlaufenden Zentrifuge einem so starken Zentrifugalfeld ausgesetzt, daß die Proteinmoleküle langsam zum Boden der Meßzelle, also nach außen, sinken. Die Sedimentationsgeschwindigkeit erhält man aus der fortlaufenden Registrierung des Konzentrationsgradienten des Proteins in der Zelle über die Dauer des Laufes, entweder photographisch mit Hilfe der Schlierenoptik oder mit Hilfe eines photoelektrischen Scanners. Die Sedimentationskonstante  $s$  ist definiert als

$$(6) \quad s = \frac{dr/dt}{\omega^2 r}$$

wobei  $\omega$  die Winkelgeschwindigkeit und  $r$  der Abstand des Konzentrationsmaximums vom Drehpunkt ist. Das Molekulargewicht erhält man aus der erweiterten Svedberggleichung:

$$(7) \quad M = \frac{RTs}{D(1 - \bar{v}\rho)} \left[ 1 + \frac{d \ln y}{d \ln c} \right]$$

Dabei ist  $R$  die Gaskonstante,  $T$  die absolute Temperatur,  $D$  die Diffusionskonstante,  $\bar{v}$  ist das partielle spezifische Volumen des Proteins,  $y$  der Aktivitätskoeffizient des Proteins, und  $c$  die Konzentration.  $\rho$  ist die Dichte des Lösungsmittels. Zur Berechnung des Molekulargewichts ist also außer dem mit der Ultrazentrifuge bestimmten Wert  $s$  unter anderem noch die Diffusionskonstante  $D$  und das spezifische Volumen  $\bar{v}$  nötig, die experimentell ermittelt werden müssen. Der Faktor  $\left[ 1 + \frac{d \ln y}{d \ln c} \right]$  nähert sich mit sinkender Proteinkonzentration dem Wert 1; er kann daher durch Untersuchungen bei verschiedenen Konzentrationen und Extrapolation auf eine Konzentration von 0 oder näherungsweise durch Messen bei sehr kleinen Konzentrationen eliminiert werden.

Bei der Gleichgewichtsmethode läuft die Ultrazentrifuge bei niedriger Rotorgeschwindigkeit so lange, bis eine Gleichgewichtsverteilung des Proteins über die Länge der Rotorzelle erreicht ist. Die Bewegung der Proteinmoleküle durch die Zentrifugalkraft in Richtung des Zellenbodens wird dann ausgegli-

chen durch eine entgegengesetzte Bewegung infolge der Diffusion längs eines Konzentrationsgradienten. Das Molekulargewicht ergibt sich aus

$$(8) \quad M = \frac{2RT \left[ 1 + \frac{d \ln y}{d \ln c} \right]}{\omega^2 (1 - \bar{v} \rho)} \cdot \frac{d \ln c}{dr^2}$$

$\frac{d \ln c}{dr^2}$  erhält man aus den Messungen nach Gleichgewichtseinstellung, für  $\left[ 1 + \frac{d \ln y}{d \ln c} \right]$  gilt das oben gesagte. Die Sedimentations- und die Diffusionskonstante werden also für diese Art der Molekulargewichtsbestimmung nicht benötigt, dafür relative Konzentrationsmessungen in Abhängigkeit von  $r$ .

Für Fraktion I-GS-6 errechnete sich aus dem Sedimentationslauf mit 60 000 UpM und einer Konzentration von etwa 0,5 mg/ml eine Sedimentationskonstante  $s_{20,w}$  von  $7,2 \pm 0,2$  S (umgerechnet auf die Viskosität und Dichte von Wasser bei  $20^\circ$ ). Trotz einer Gerinnbarkeit von nur 78 % erwies sich dabei das Material als praktisch homogen, nur ein ganz geringer Prozentsatz an höhermolekularen Verunreinigungen war feststellbar.

Der Gleichgewichtslauf bei 5600 UpM ergab ein Molekulargewicht von  $320\,000 \pm 10\%$  (Mittelwert aus zwei Präparationen), wobei ein  $\bar{v}$  von 0,718 zugrunde gelegt wurde. Diese Werte unterschieden sich nur wenig von denen der Fraktion I-4 mit einem  $s_{20,w}$  von 7,5 und einem Molekulargewicht von 330 000 (66).

+ Herrn Dr. H. Prieß danke ich herzlich für die Durchführung dieser Untersuchungen.

#### 4. Bestimmung der Thrombinzeit

Als Thrombinzeit einer Fibrinogenlösung bezeichnet man die Dauer des Gerinnungsvorgangs, der durch die Zugabe von Thrombin ausgelöst wird. Als Kriterium für die eingetretene Gerinnung gilt das erste Auftreten eines Fibrinfadens an einem Haken, der mehrmals in der Sekunde durch das Reaktionsgemisch geführt wird.

Die Thrombinzeit von I-GS-6 war gegenüber der von I-4 deutlich verlängert. Als Mittelwerte ergaben sich für I-GS-6 19,6 sec und für I-4 13,1 sec (Tab.7)

Tab. 8. Thrombinzeiten von I-GS-6 und I-4 aus drei verschiedenen Präparationen. Angegeben sind die Mittelwerte aus jeweils vier Einzelbestimmungen.

---

|        |     |          |
|--------|-----|----------|
| I-GS-6 | (1) | 20,6 sec |
|        | (2) | 19,1 sec |
|        | (3) | 19,2 sec |
| I-4    | (1) | 13,7 sec |
|        | (2) | 12,6 sec |
|        | (3) | 12,9 sec |

---

#### 5. Fibrinpolymerisationstest

Bei diesem Test wurde der Gerinnungsvorgang spektrophotometrisch bei einer Extinktion von 300  $m\mu$  verfolgt.

Durch die Zugabe von Thrombin zu einer fibrinogenhaltigen Lösung kommt es zur Entstehung von Fibrinmonomeren, deren Polymerisation eine Trübung der Lösung bewirkt. Diese Trübung macht sich durch eine Zunahme der Extinktion bemerkbar.

Die zu untersuchende Fibrinogenlösung wurde nach Verdünnung mit Barbituratpuffer mit einem Thrombinreagenz versetzt und über 30 Minuten die Extinktion registriert. Im Falle von I-4 erhielt man eine Kurve, die in den ersten 10 Minuten steil anstieg, dann flacher wurde und etwa ab der 20. Minute nahezu abszissenparallel verlief; der Anstieg aus der 0-Linie begann nach einer Minute. Demgegenüber zeigte I-GS-6 bei gleicher Konzentration, bestimmt anhand der Extinktionsdifferenz bei 283  $m\mu$  und 320  $m\mu$ , signifikante Unterschiede: der Kurvenbeginn lag hier etwa eine Minute später, was der verlängerten Thrombinzeit entsprach, und die Extinktion nach 30 Minuten war nur etwa halb so groß wie bei I-4; genau ergab sich das Verhältnis der Extinktionen von I-GS-6 und I-4 zu 0,59 (Abb. 18).

Die Extinktion des Ansatzes mit I-GS-6 stieg auch später nicht weiter an, wie Bestimmungen nach 100 Minuten sowie nach 6 und 12 Stunden bewiesen; sie erhöhte sich nur unwesentlich von 0,55 nach 30 Min. auf 0,58 nach 12 Stunden.

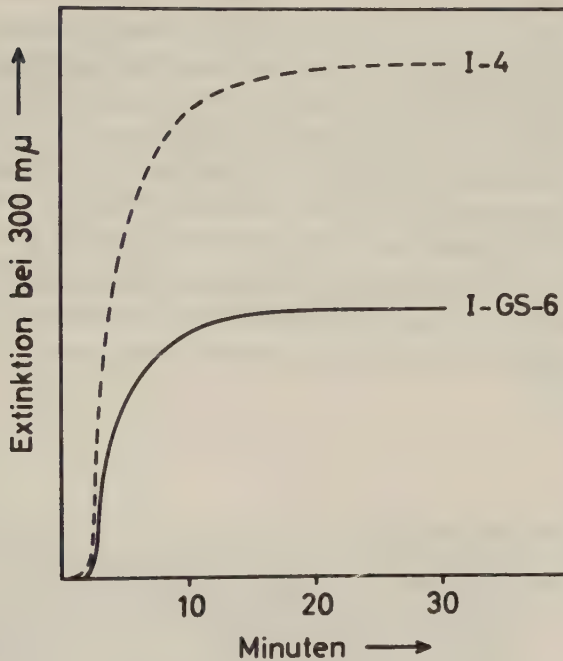


Abb. 18. Fibrinpolymerisationstest. Die Konzentration von I-4 bzw. I-GS-6 beträgt je 2,1 mg/ml.

#### 6. Test auf Faktor XIII

Faktor XIII führt am Ende der zweiten Phase der Gerinnung (siehe Einleitung) das harnstofflösliche Fibrin-s in harnstoffunlösliches Fibrin-i über. Die bisher nur durch Nebenvalenzkräfte zusammengehaltenen Fibrinmonomeren werden dabei durch kovalente Bindungen verknüpft. Faktor XIII ist in den meisten Präparationen von Fibrinogen in Form einer inaktiven Vorstufe enthalten, so in I-4, gereinigt nach Blombäck (54), ebenso wie in Glycin- oder  $\beta$ -Alanin-präzipitaten (47, 48). Er kann nur durch besondere Verfahren entfernt werden,

z.B. durch Adsorption mit Triäthylaminoäthyl-Cellulose (43).

Zur Untersuchung, ob Fibrin, das aus Fraktion I-GS-6 gebildet wurde, in Fibrin-i übergeht, wurde die von Laki und Lorand (82) angegebene Methode verwendet. Dabei wird Faktor XIII, der in den Präparaten enthalten ist, durch Thrombin,  $\text{Ca}^{++}$  und Cystein in seine aktive Form überführt und katalysiert während des Gerinnungsvorgangs dann die Ausbildung von kovalenten Bindungen zwischen den zusammengelagerten Fibrinmonomeren. Fibrin-s wird zu Fibrin-i, was sich in der Unlöslichkeit in 5 M Harnstoff zeigt.

Getestet wurden der Glycinüberstand, I-GS-6 und zum Vergleich I-4. Wie Tab.9 zeigt, liegt sowohl im Glycinüberstand als auch in Fraktion I-GS-6 Faktor XIII vor. Seine Aktivität liegt in derselben Größenordnung wie im Falle von Fraktion I-4.

Tab. 9. Test auf Faktor XIII

|                 | Fibrinogenkonzentration<br>(mg/ml) | % des F'gens gelöst nach<br>24 h in 5 M Harnstoff |
|-----------------|------------------------------------|---------------------------------------------------|
| Glycinüberstand | 0,7                                | 27                                                |
| Fraktion I-GS-6 | 4,0                                | 16                                                |
| Fraktion I-4    | 4,0                                | 21                                                |

#### 7. Diskelektrophorese der S-Sulfoderivate von Fibrinogen und Fibrin

Die Untersuchungen erfolgten an 7,5 % igem Polyacrylamidgel bei pH 8,3, einer Stromstärke von 3 - 4 mA/Gel und einer Laufzeit von 4 Stunden. Die Ergebnisse zeigt die Abb. 19. Die Auftrennung von sulfitolysiertem Fibrinogen der Fraktion I-4 ergibt drei Banden, die in Laufrichtung, also von rechts nach links, der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kette entsprechen. Das Sulfitolysat der Fraktion I-GS-6 zeigte demgegenüber nur zwei Banden deutlich, die im Bereich der  $\beta$ - und  $\gamma$ -

Bande von I-4 wanderten. Eine ausgeprägte  $\alpha$ -Bande war nicht zu sehen, an ihrer Stelle fanden sich mehrere feine Linien, die in den einzelnen Präparationen in ihrer Ausprägung schwankten. Die  $\beta$ -Bande war stets etwas breiter als bei I-4. Um feststellen zu können, inwieweit einzelne Banden von I-GS-6 durch nichtgerinnbare Anteile verursacht wurden, wurde das gerinnbare Material von I-GS-6 mit Thrombin ausgefällt und der Überstand sulfitolysiert und ebenfalls diskelektrophoretisch untersucht. (Abb. 19 A unten).

Ähnliche Bilder erhielt man bei der Elektrophorese von sulfitolysiertem Fibrin-s aus Fraktion I-GS-6; auch hier fanden sich wieder eine  $\beta$ - und  $\gamma$ -Bande, während eine eigentliche  $\alpha$ -Bande fehlte.

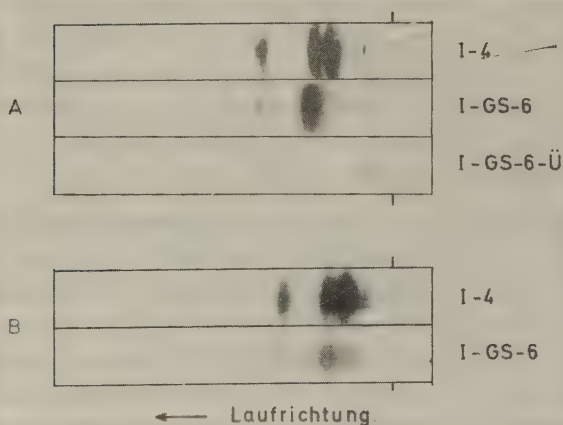


Abb. 19. Diskelektrophorese von S-Sulfoderivaten des Fibrinogens und Fibrins.  
A: S-Sulfofibrinogen. Oben I-4, Mitte I-GS-6, unten sulfitolysierter Überstand von I-GS-6 nach Ausfällung des gerinnbaren Materials mit Thrombin.  
B: S-Sulfofibrin. Oben I-4, unten I-GS-6.

## 8. Ionenaustauschchromatographie der S-Sulfoderivate von Fibrinogen

Das Prinzip der Ionenaustauschchromatographie besteht in der reversiblen Bindung positiv oder negativ geladener Substanzen an anionische oder kationische Gruppen des Austauschermaterials, meist Cellulose; durch Auswaschen mit Puffern mit steigender oder fallender Ionenstärke oder steigendem oder fallendem pH-Wert wird die Säule entwickelt. Dabei werden verschiedene Substanzen, je nach der Festigkeit ihrer Bindung an das Austauschermaterial, zu verschiedenen Zeiten eluiert. Diese Bindung hängt einerseits von der Substanz selbst, andererseits von der momentanen Ionenstärke und dem pH des Elutionspuffers ab.

Für die Untersuchung von I-GS-6 wurde die von Henschen (79) beschriebene Methode zur Trennung von S-Sulfofibrinogenderivaten an CM-Cellulose, einem Kationenaustauscher, übernommen. Als Trenngel kam Whatman CM-Cellulose CM 52 in 8 M Harnstoff zur Anwendung. Die Elution wurde mit einem linearen Natriumacetatgradienten von 0,005 M gegen 0,1 M in 8 M Harnstoff bei pH 5,3 durchgeführt. Unter diesen Bedingungen erhält man für sulfitolysiertes I-4 ein charakteristisches Elutionsdiagramm (gestrichelt in Abb. 20): als erstes werden die  $\gamma$ -Ketten eluiert, die deutlich von den nachfolgenden  $\beta$ - und  $\alpha$ -Fraktionen abgesetzt erscheinen.  $\beta$  und  $\alpha$  gehen ineinander über und lassen sich unter den angeführten Bedingungen nur unvollständig trennen. Der Gipfel, der die  $\gamma$ -Ketten enthält, ist stets höher als der der  $\beta$ - und  $\alpha$ -Ketten.

Das sulfitolysierte Material der Fraktion I-GS-6 zeigte demgegenüber einige bemerkenswerte Unterschiede (ausgezogen in Abb. 20): Nach einer gut abgesetzten  $\gamma$ -Fraktion erschien ein einzelner ziemlich hoher Elutionsgipfel, dessen Maximum zwischen den  $\beta$ - und  $\alpha$ -Fraktionen von I-4 lag, aber mehr zu  $\beta$  hin verschoben war. Abgesehen von einer kleinen Schulter, die im Bereich der  $\alpha$ -Kette von I-4 erschien, war eine Abstufung, die auf eine Heterogenität des Materials schließen ließe, nicht feststellbar. Der Elutionsgipfel umfaßte den ganzen Bereich, in dem die  $\beta$ - und  $\alpha$ -Ketten von Fibrinogen I-4 eluiert wurden. Er war in seinem Maximum stets höher als der Gipfel der  $\gamma$ -Fraktion.

Berechnet man die Fläche unter den einzelnen Gipfeln als Maß für die Proteinmengen der einzelnen Fraktionen, so erhält man folgende Werte: bei I-GS-6 verhalten sich die Flächen von  $\gamma$ - und Hauptgipfel (ohne Schulter) wie 1 : 3,3, während bei I-4 das Verhältnis von  $\gamma$  :  $\beta$  :  $\alpha$  wie 1 : 1,7 : 1,1 ist. Das läßt darauf schließen, daß der Hauptgipfel von I-GS-6 doppelt soviel Protein ent-

hält wie der  $\beta$ -Gipfel von I-4, bezogen auf die Fläche des zugehörigen  $\gamma$ -Gipfels.

Auch hier zeigte sich also, wie bei den diskelektrophoretischen Untersuchungen, der Hauptunterschied in einem Verschwinden der  $\alpha$ -Kette.  $\beta$ - und  $\gamma$ -Ketten schienen in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit weniger bzw. nicht verändert zu sein. Daneben fällt der hohe Elutionsgipfel im  $\beta$ -Bereich auf.

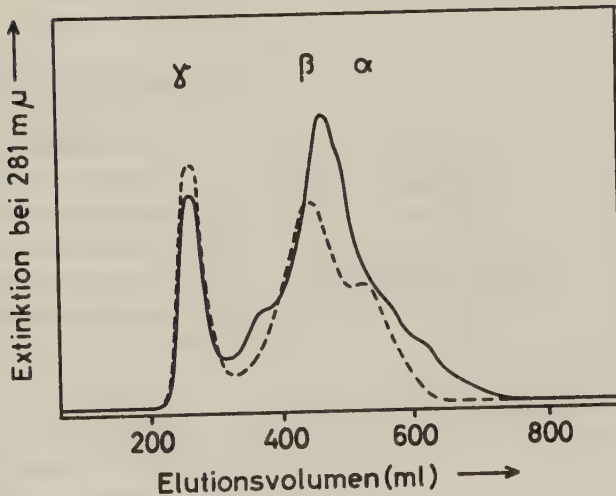


Abb. 20. Ionenaustauschchromatographie von S-Sulfofibrinogen an CM-Cellulose. Ausgezogen: S-Sulfofibrinogen der Fraktion I-GS-6. Gestrichelt: S-Sulfofibrinogen der Fraktion I-4.  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  bezeichnen die den Einzelketten entsprechenden Gipfel bei I-4.

## E . D I S K U S S I O N

In der vorliegenden Arbeit wurde der Anteil von Fibrinogen, welcher nach Ausfällung der Hauptmenge dieses Proteins aus Rinderplasma mit 2,1 M Glycin bei 5° in Lösung bleibt, isoliert. Er wurde als gerinnbare Begleitkomponente, die sich von Normalfibrinogen (Fraktion I-4) in einigen Punkten unterscheidet, charakterisiert. Seine Menge macht durchschnittlich 16 % des gesamten Fibrinogens aus.

In Vorversuchen wurde zunächst die Fällbarkeit des Fibrinogens im Überstand (Fraktion I-GS) durch Äthanolgemische untersucht. Bei Äthanolkonzentrationen zwischen 9 und 24 % entsprach sie weitgehend der von Normalfibrinogen. Das angereicherte Produkt zeigte bei Sättigung seiner Lösung mit Glycin, entsprechend einer Konzentration von 2,1 M, eine sehr viel höhere Löslichkeit als gesamtes Plasmafibrinogen oder Fraktion I-4. Letztere wurden zu 85 bzw. 98 % präzipitiert, dagegen blieben 61 % von Fraktion I-GS in Lösung. Offensichtlich handelt es sich somit um ein Derivat des Fibrinogens, welches eine höhere Löslichkeit besitzt.

Unter Berücksichtigung dieser Vorversuche wurde ein Anreicherungsschema ausgearbeitet. Es bestand aus fünf Fällungsschritten und einer anschließenden Reinigung an Bio-Gel A-5. Bei den Fällungen wurde die Tatsache ausgenutzt, daß Fibrinogen zu den am schlechtesten löslichen Plasmaproteinen gehört. Das trifft auch noch auf die hier untersuchte Komponente zu, obwohl sie eine etwas bessere Löslichkeit als Normalfibrinogen aufweist.

Es wurde folgendermaßen vorgegangen:

Nach zwei Fällungen mit 25 bzw. 15 % Äthanol in der Kälte (-5°), deren erste hauptsächlich der Entfernung des Glycins diente, das dabei vollständig im Überstand blieb, wurde das Material zweimal mit Ammoniumsulfat bei 28,6 %iger Sättigung präzipitiert, und anschließend mit 2,5 M  $\beta$ -Alanin gefällt. Die so vorbereitete Fraktion I-GS-5 wurde zuletzt einer Reinigung durch Gelfiltration an Bio-Gel A-5 unterworfen, wo sich noch höher- und niedrigermolekulare Begleitproteine abtrennen ließen. Endprodukt war Fraktion I-GS-6.

Bei dieser Aufarbeitung wurde eine Ausbeute von durchschnittlich 50 % und eine Gerinnbarkeit des Endmaterials von im Mittel 78 % erreicht, was einer 40-fachen Anreicherung entspricht.

Alle weiteren Versuche, durch zusätzliche Fällungen oder Anwendung der trägerfreien Elektrophorese eine höhere Gerinnbarkeit zu erreichen, schlugen fehl. Es zeigte sich jedoch, daß gröbere Verunreinigungen durch Fremdproteine, wie man sie auf Grund der relativ niedrigen Gerinnbarkeit vermuten könnte, nicht vorhanden waren. So verhielt sich das Material bei der Gelfiltration homogen. Die Untersuchungen in der Ultrazentrifuge zeigten zwar Verunreinigungen, diese überstiegen aber niemals einige wenige Prozent und hatten ein erheblich höheres Molekulargewicht als Fibrinogen. Ähnliche Anteile konnten in einigen Fällen bei Gelelektrophorese von unsulfitolysiertem Material beobachtet werden. Sie stellten offenbar Polymere dar, wie sie manchmal auch bei Normalfibrinogen vorkommen (89).

Man kann deshalb annehmen, daß es sich bei dem Anteil von etwa 22 % an nichtgerinnbarem Material zum größten Teil um geschädigtes Fibrinogen der Fraktion I-GS-6 handelt. Wahrscheinlich hat es durch Denaturierung oder unter dem Einfluß proteolytischer Enzyme wie Plasmin oder Thrombin, die nur sehr schwer vollständig von Fibrinogen abzutrennen sind, seine Fähigkeit zur Gerinnung eingebüßt, stimmt aber in seinen physikochemischen Eigenschaften mit dem gerinnbaren Anteil überein. Dafür spricht auch die Beobachtung, daß Material der Fraktion I-GS-6, das mehrere Tage bei Raumtemperatur aufbewahrt worden war, in einigen Fällen seine Gerinnbarkeit vollständig verloren hatte, während es elektrophoretisch nicht von gerinnbarem Material zu unterscheiden war.

Zur näheren Charakterisierung der isolierten Fraktion wurden ihre physikochemischen und biologischen Eigenschaften untersucht. Analoge Versuche wurden mit Normalfibrinogen der Fraktion I-4 zum Vergleich durchgeführt.

Bei der Gelfiltration an Sepharose und Agarose sowie der Diskelektrophorese des Gesamtmoleküls zeigte die Fraktion I-GS-6 nur geringe Unterschiede gegenüber I-4. Die Elution erfolgte auf Agarosegelen etwas später; das Verhältnis von Elutionsvolumen zu Leervolumen betrug bei Verwendung von Bio-Gel A-5 für I-GS-6 1,84 gegenüber 1,77 für I-4. Die elektrophoretische Beweglichkeit auf Polyacrylamidgel war bei I-GS-6 etwas größer. Wie auf Abb. 13, 16 und 17 zu erkennen, ist bei diesen Versuchen der Bereich, in dem sich I-GS-6 und I-4

Überlappen, ziemlich groß, was darauf schließen läßt, daß nur geringe Unterschiede in Molekülform, -ladung und -gewicht bestehen.

Die Untersuchungen in der Ultrazentrifuge ergaben im Sedimentationslauf eine Sedimentationskonstante  $s_{20,w}^0$  von 7,2 und im Gleichgewichtslauf ein Molekulargewicht von 320 000. Beide Werte liegen nur wenig unter den für I-4 bekannten ( $s_{20,w}^0$  7,5, Molekulargewicht 330 000 (66)).

Dagegen zeigten die biologischen Eigenschaften, von denen Thrombinzeit und Fibrinpolymerisation untersucht wurden, signifikante Unterschiede zu I-4. Die Thrombinzeit lag mit 19,6 Sekunden um 50 % höher als bei Normalfibrinogen (13,6 Sekunden). Die Polymerisationsfähigkeit der Fibrinmonomeren war deutlich herabgesetzt. Dies bewies die Messung der Trübung bei 300 m $\mu$ , die nach Eintritt der Gerinnung nur auf etwa die Hälfte des Wertes von I-4 anstieg. Eine Verlängerung der Thrombinzeit wäre zwar auch durch Verunreinigung mit Fibrinogenabbauprodukten möglich, die teilweise eine stark gerinnungshemmende Wirkung besitzen (90, 91). Eine solche Verunreinigung kann aber auf Grund der Aufarbeitungsbedingungen ausgeschlossen werden. Bei den Bruchstücken mit Antithrombineffekt handelt es sich um die Fragmente Y, D und E nach Marder (90). Sie haben ein wesentlich geringeres Molekulargewicht - es liegt für Y bei 155 000, für D bei 83 000 und für E bei 50 000 (90) - und hätten daher spätestens bei der Gelfiltration abgetrennt werden müssen. Außerdem wären sie in der Diskelektrophorese und der Ultrazentrifuge in Erscheinung getreten. Auch ihre Löslichkeit in Ammoniumsulfatlösungen ist erheblich höher als die von Fibrinogen; unter den hier gewählten Bedingungen von 28,6 % Sättigung hätten sie zum größten Teil in Lösung bleiben müssen (92). Die verlängerte Thrombinzeit dürfte deshalb ihre Ursache in einer veränderten Molekülstruktur haben.

Der positive Ausfall des Tests auf Faktor XIII zeigt, daß dieses Enzym auch in Fraktion I-GS-6 vorhanden ist und die Ausbildung kovalenter, harnstoffunlöslicher Bindungen zwischen Fibrinmonomeren katalysiert. Faktor XIII wird in den meisten, auch hochgereinigten Fraktionen gefunden (47, 48, 54) und hat offenbar sehr ähnliche physikochemische Eigenschaften wie Fibrinogen. Daneben ist dieser Test aber auch ein Beweis für das Vorhandensein intakter  $\gamma$ -Ketten in Fraktion I-GS-6, da diese an der Quervernetzung durch kovalente Bindungen beteiligt sind (32, 33, 34).

Die Untersuchung der S-Sulfoderivate, also der Einzelketten, läßt erkennen,

daß die Fraktion I-GS-6 sich auch im Aufbau des Moleküls aus seinen Untereinheiten von I-4 unterscheidet. Es ließ sich ein fast vollständiges Fehlen der  $\alpha$ -Ketten feststellen, das sowohl in der Diskelektrophorese als auch bei der Ionenaustauschchromatographie zu beobachten war. Die Spuren von  $\alpha$ -Ketten im Elektropherogramm sowie die Schulter im Bereich des  $\alpha$ -Gipfels des Chromatogramms dürften auf unvollständig abgetrenntes I-4 zurückzuführen sein.

Die hier noch einmal kurz zusammengefaßten Befunde zeigen eindeutig, daß das Material der Fraktion I-GS-6 wesentliche Unterschiede gegenüber dem Normalfibrinogen der Fraktion I-4 aufweist. Es stellt sich nun die Frage nach der Herkunft des isolierten Materials.

Dafür bieten sich zwei Antworten an:

Einmal könnte es sich um ein noch gerinnbares Abbauprodukt des Normalfibrinogens handeln. Solche Abbauprodukte wurden in den letzten Jahren genauer untersucht und sowohl aus Plasma isoliert (61) als auch in vitro hergestellt (62, 90, 92).

Zum zweiten wäre aber auch an eine bereits bei der Biosynthese auftretende Variante des Fibrinogens zu denken. Diese Möglichkeit wird bereits für einige andere Fibrinogenfraktionen diskutiert, so für das von Witt und Mitarbeitern (47) gefundene fetale Fibrinogen, für die von Wuppermann und Hörmann (65) näher untersuchte Fraktion I-9 und das aus Thrombozyten isolierte Fibrinogen, das von Ganguly (93) beschrieben wurde.

Alle Deutungsversuche müssen

- a) das Fehlen von  $\alpha$ -Ketten in Elektropherogramm und Ionenaustauschchromatogramm, und
  - b) das Molekulargewicht von 320 000
- ausreichend erklären.

Die anderen Befunde - Verhalten bei der Gelchromatographie, erhöhte elektrophoretische Beweglichkeit, Lösungsverhalten, Thrombinzeit und Polymerisationsfähigkeit - lassen sich aus den Konformations- und Ladungsänderungen, die durch die Veränderungen im Molekülaufbau bedingt sind, sowie aus dem etwas verringerten Molekulargewicht ableiten.

Diskutiert man zunächst die Möglichkeit, daß es sich bei I-GS-6 um ein Abbauprodukt handelt, so ist ein Vergleich mit anderen gerinnbaren Fibrinogenab-

bauprodukten nützlich (Tab. 10), wie sie in der Literatur mehrfach beschrieben wurden.

Dazu gehören die in vivo vorkommende Fraktion I-8 (61), die aus Plasma isoliert wurde, sowie Derivate, die durch die Einwirkung von Plasmin auf Fibrinogen in vitro entstanden. Es handelt sich dabei um das "first derivative" von Fletcher und Mitarbeitern (92), die Fraktion I-8D<sub>5</sub> von Sherman, Mosesson und Sherry (62) und das Fragment X von Marder und Mitarbeitern (90).

Wie bei Fraktion I-GS-6 sind auch bei einigen dieser Derivate Veränderungen im Kettenaufbau zu finden. Von "first derivative" und Fraktion I-8D<sub>5</sub> liegen keine Untersuchungen der Einzelketten vor. Fraktion I-8 und Fragment X dagegen weisen veränderte  $\alpha$ -Ketten auf, während  $\beta$ - und  $\gamma$ -Ketten intakt sind. Fragment X besitzt eine wesentlich leichtere  $\alpha$ -Kette mit einem Molekulargewicht von etwa 25 000 (94). Untersuchungen der Einzelketten von I-8 erbrachten unterschiedliche Ergebnisse. Mills und Karparkin (95) konnten durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese der S-Sulfoderivate dieser Fraktion keine  $\alpha$ -Ketten nachweisen; Mosesson und Mitarbeiter dagegen beschrieben eine "mehr diffuse und schneller wandernde  $\alpha$ -Bande" (96).

Neben den Veränderungen im Bereich der  $\alpha$ -Ketten zeigt I-GS-6 noch einige weitere Gemeinsamkeiten mit den Fibrinogenabbauprodukten; so die gegenüber I-4 verzögerte Elution bei der Gelfiltration, die erhöhte elektrophoretische Beweglichkeit, die verlängerte Thrombinzeit und die herabgesetzte Polymerisationsfähigkeit.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen I-GS-6 und den bekannten Abbauprodukten besteht jedoch im Molekulargewicht. Dieses ist mit Werten von 240 000 - 269 000 bei allen Abbauprodukten ähnlich und signifikant niedriger als das von I-GS-6 mit 320 000. Falls I-GS-6 ebenfalls ein Abbauprodukt ist, muß man in Anbetracht des hohen Molekulargewichts annehmen, daß nur relativ kleine Bruchstücke abgespalten worden sind, deren Molekulargewicht insgesamt 10 000-15 000 nicht überschreitet. Die Abspaltung von Bruchstücken dieser Größenordnung ließe auch eine Erklärung für das Fehlen der  $\alpha$ -Bande im Elektropherogramm bzw. des  $\alpha$ -Gipfels im Chromatogramm zu. Wird nämlich von jeder  $\alpha$ -Kette ein Anteil mit einem Molekulargewicht von 7500 abgespalten, so hat die verbliebene Restkette ein Molekulargewicht, das dem einer  $\beta$ -Kette gleich ist. Es wäre denkbar, daß sich diese Restkette auch in Elektrophorese und Ionenaustauschchromatogramm wie eine  $\beta$ -Kette verhält.

Tab. 10. Vergleich von Fraktion I-6S-6 mit anderen Fibrinogenfraktionen

|                                               | Fraktion<br>I-6S-6 | Fraktion<br>I-8  | "first<br>derivative" | Fraktion<br>I-8D <sub>5</sub> | Fragment<br>X    | Fraktion<br>I-4 |
|-----------------------------------------------|--------------------|------------------|-----------------------|-------------------------------|------------------|-----------------|
| verzögerte Elution<br>bei der Gelfiltration   | +                  | +                | keine<br>Angaben      | keine<br>Angaben              | keine<br>Angaben | ∅               |
| erhöhte elektrophore-<br>tische Beweglichkeit | +                  | +                | +                     | +                             | +                | ∅               |
| s <sub>20,w</sub> <sup>0</sup>                | 7,2                | 7,5              | 7,7                   | 7,4                           | 7,0              | 7,5             |
| Molekulargewicht                              | 320 000            | 269 000          | 265 000               | 262 000                       | 240 000          | 330 000         |
| verlängerte<br>Thrombinzeit                   | +                  | +                | +                     | +                             | +                | ∅               |
| herabgesetzte Polyme-<br>risationsfähigkeit   | +                  | +                | +                     | +                             | keine<br>Angaben | ∅               |
| veränderte bzw.<br>fehlende α-Ketten          | +                  | +                | keine<br>Angaben      | keine<br>Angaben              | +                | ∅               |
| Literatur                                     | -                  | 61, 62<br>95, 96 | 92                    | 62                            | 90, 94           | 66              |

Für diese Art der Entstehung von I-GS-6 bestehen allerdings noch keine Anhaltspunkte in den bisherigen Kenntnissen über den Plasminabbau des Fibrinogens. Darauf sei noch kurz eingegangen.

Die Einwirkung des Plasmins auf Fibrinogen und die dabei entstehenden Spaltprodukte sind in den letzten Jahren eingehend untersucht worden. Es wurde nachgewiesen, daß als erste die  $\alpha$ -Ketten am Carboxylende angegriffen werden (Gaffney und Dobos (97) zogen daraus den Schluß, daß sie zum größten Teil an der Oberfläche des Moleküls lokalisiert seien). Dieser erste Angriff von Plasmin am Fibrinogenmolekül führt nach den Untersuchungen von Marder und Mitarbeitern (90) sowie Pizzo und Mitarbeitern (94) zur Abspaltung ziemlich großer Peptide, der Fragmente A, B und C mit einem Molekulargewicht von je 15 000, und damit zum Fragment X, dessen Molekulargewicht 240 000 beträgt. Diese Ergebnisse wurden aus Experimenten mit Humanfibrinogen gewonnen; zu ganz ähnlichen Aussagen kamen auch Weinberg und Mihalyi (98), die den Abbau von Rinderfibrinogen studiert hatten. Sie stellten fest, daß der initiale Angriff von Plasmin an den  $\alpha$ -Ketten ansetzt, in der Spaltung von zwei oder drei Peptidbindungen besteht und zu einer schnellen Konformationsänderung des Moleküls mit einem Verlust von etwa 20 % des ursprünglichen Molekulargewichts führt.

Nach diesen Untersuchungen ist also die Existenz eines Spaltprodukts mit einem so hohen Molekulargewicht, wie es I-GS-6 besitzt, nicht sehr wahrscheinlich. In einer vor kurzem erschienenen Arbeit beschrieben Mills und Karparkin (99) zwar als erstes Plasminabbauprodukt ein Derivat mit einem Molekulargewicht von 317 000, hier war aber nur eine  $\alpha$ -Kette des Moleküls angegriffen worden, während die zweite noch intakt war. Wäre I-GS-6 auf diese Weise entstanden, hätte diese unversehrte  $\alpha$ -Kette aber nachweisbar sein müssen. Die andere, abgebaute  $\alpha$ -Kette, die ja bei einem Gewichtsverlust von mindestens 13 000 leichter als eine  $\beta$ -Kette sein muß, hätte bei der Elektrophorese ebenfalls in Erscheinung treten müssen.

Erwähnt werden soll noch eine kürzlich beschriebene weitere Möglichkeit zur Entstehung von Fibrinogenspaltprodukten. Nicht nur Plasmin, sondern auch Thrombin und andere, nicht an Gerinnung oder Fibrinolyse beteiligten Enzyme wie Trypsin und Chymotrypsin sind nämlich imstande, Fibrinogen abzubauen; auch sie greifen zuerst die  $\alpha$ -Ketten an. Mills und Karparkin (100) schlossen aus Vergleichen von in vitro gewonnenen Plasminabbauprodukten mit hochlöslichen Fibrinogenfraktionen, die aus Plasma isoliert worden waren, daß letztere

durch die Wirkung eines anderen proteolytischen Enzyms, wahrscheinlich Thrombin, entstanden sein dürften. Die bis jetzt veröffentlichten Untersuchungen in dieser Richtung sind aber noch nicht ausführlich genug, um daraus Schlüsse auf eine mögliche Entstehung von Fraktion I-GS-6 zu ziehen.

Überprüft man nun die zweite oben angeführte Hypothese, bei I-GS-6 handle es sich bei der Biosynthese auftretende Variante des Fibrinogens, so kann man feststellen, daß sich diese sehr gut mit allen Befunden in Einklang bringen läßt.

Ausgehend von Elektrophoresebild und Ionenaustauschchromatogramm der Einzelketten kann man annehmen, daß die  $\alpha$ -Ketten tatsächlich fehlen. Ein nur aus zwei  $\beta$ - und zwei  $\gamma$ -Ketten bestehendes Molekül hätte aber nur ein Molekulargewicht von 206 000, wenn man die aus der Literatur bekannten Molgewichte der Einzelketten (56 000 für  $\beta$ , 47 000 für  $\gamma$  (11, 101) zugrundelegt. Unterstellt man aber, daß das Molekül aus zwei  $\gamma$ - und vier  $\beta$ -Ketten zusammengesetzt ist, so erhält man einen Wert von 318 000, der praktisch gleich dem für I-GS-6 gefundenen Molekulargewicht von 320 000 ist.

Auch eine genauere Analyse des Elektrophoresebildes (Abb. 19) und des Ionenaustauschchromatogramms (20) des Sulfitolysates von Fraktion I-GS-6 spricht für die Annahme eines Hybriden des Fibrinogens, bei dem die zwei  $\alpha$ - durch zwei weitere  $\beta$ -Ketten ersetzt sind. Sowohl die im Vergleich zur  $\gamma$ -Bande wesentlich stärkere  $\beta$ -Bande im Diskelektropherogramm als auch der hohe  $\beta$ -Gipfel im Ionenaustauschchromatogramm machen dies wahrscheinlich. Im Chromatogramm von Normalfibrinogen der Fraktion I-4 ist der  $\beta$ -Gipfel stets niedriger als der von  $\gamma$ ; im Fall von I-GS-6 ist er höher. Planimetriert man die Fläche unter den einzelnen Gipfeln, als Maß für die Proteinmenge der Einzelfraktionen, so kann man feststellen, daß der Hauptgipfel von I-GS-6, der einem  $\beta$ -Gipfel entsprechen dürfte, genau doppelt soviel Protein enthält wie der  $\beta$ -Gipfel von I-4, wenn beide Werte auf die Fläche des zugehörigen  $\gamma$ -Gipfels bezogen werden. Man kann also annehmen, daß bei I-GS-6 die doppelte Menge an  $\beta$ -Ketten vorhanden ist.

Auch alle anderen Befunde lassen sich gut mit der vorgeschlagenen Molekülzusammensetzung vereinbaren.

Die verzögerte Elution bei der Gelfiltration und die erhöhte elektrophoretische Beweglichkeit dürften die Folge des verringerten Molekulargewichts sein.

Für die verlängerte Thrombinzeit und die herabgesetzte Polymerisationsfähigkeit können Konformations- und Ladungsänderungen verantwortlich gemacht werden, wie sie durch den Ersatz von zwei  $\alpha$ - durch zwei  $\beta$ -Ketten anzunehmen sind. Eine veränderte Molekülform könnte den Angriff von Thrombin oder die anschließende Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen erschweren und damit zwangsläufig die Gerinnungsfähigkeit beeinträchtigen.

Zusammenfassend kann man feststellen, daß die Annahme, bei I-GS-6 handle es sich um ein Abbauprodukt des normalen Fibrinogens, eine Erklärung der experimentell ermittelten Daten zwar erlaubt; diese Erklärung steht aber in Widerspruch zu allen bisher bekannten Ergebnissen von Untersuchungen des Plasminabbaus von Fibrinogen und der dabei entstehenden Produkte.

Deswegen dürfte es wahrscheinlicher sein, daß das Fibrinogen der Fraktion I-GS-6 eine eigene Verbindung mit der Kettenanordnung  $\beta_4 \gamma_2$  darstellt. Diese Hypothese läßt sich durch die hier vorgelegten Ergebnisse in befriedigender Weise stützen; um den endgültigen Beweis dafür zu erbringen, müssen allerdings noch umfangreiche weitere Versuche durchgeführt werden.

## F. ZUSAMMENFASSUNG

Eine gerinnbare Begleitkomponente des Fibrinogens, die nach Ausfällung der Hauptmenge dieses Proteins aus Rinderplasma mit 2,1 M Glycin bei 5° in Lösung bleibt, wurde isoliert und charakterisiert.

Die Isolierung erfolgte in sechs Schritten: nach zwei Äthanolpräzipitationen mit 25 bzw. 15 % erfolgte eine Ausfällung des Materials mit Ammoniumsulfat bei 28,6 % iger Sättigung; eine Repräzipitation unter den gleichen Bedingungen schloß sich an. Der nächste Schritt war eine Fällung mit  $\beta$ -Alanin, bei einer Konzentration von 2,5 M. Zuletzt wurde noch eine Reinigung an Agarose (Bio-Gel A-5) durchgeführt.

Das auf diese Weise erhaltene Material wies eine Gerinnbarkeit von durchschnittlich 78 % bei einer mittleren Ausbeute von 50 % auf. Trotz der relativ niedrigen Gerinnbarkeit ließen sich auf der Diskelektrophorese und in der Ultrazentrifuge nur Spuren von Verunreinigungen nachweisen; daraus wurde geschlossen, daß der größte Teil des nichtgerinnbaren Materials aus Fibrinogen bestand, das seine Gerinnungsfähigkeit eingebüßt hatte.

Die Gelfiltration an Agarose (Bio-Gel A-15 und A-5) zeigte eine gegenüber Fraktion I-4 geringfügig verzögerte Elution; auf der Diskelektrophorese wurde eine etwas höhere Wanderungsgeschwindigkeit beobachtet. Untersuchungen in der Ultrazentrifuge ergaben eine Sedimentationskonstante  $s_{20,w}^0$  von 7,2 und ein Molekulargewicht von 320 000.

Die biologischen Eigenschaften zeigten signifikante Unterschiede zu I-4. Die Thrombinzeit lag bei 19,6 Sekunden, gegenüber 13,1 bei I-4. Die Extinktion bei 300  $\mu$ , 30 Minuten nach Eintritt der Gerinnung gemessen, die ein Maß für die Polymerisationsfähigkeit des Materials darstellt, war nur etwa halb so hoch wie bei I-4 gleicher Konzentration.

Der Test auf Faktor XIII war positiv, was die Anwesenheit dieses Enzyms im Material der Fraktion I-6S-6 sowie das Vorhandensein intakter  $\gamma$ -Ketten bewies.

Bei der Untersuchung der S-Sulfoderivate stellte sich heraus, daß intakte  $\alpha$ -

Ketten fast vollständig fehlten; diese Beobachtung wurde sowohl bei der Disk-elektrophorese als auch der Ionenaustauschchromatographie an CM-Cellulose gemacht.

Auf Grund der hier dargestellten Ergebnisse und dem Vergleich mit bisher beschriebenen Fibrinogenfraktionen sowie unter Berücksichtigung der bisherigen Kenntnisse über den Plasminabbau von Fibrinogen wurde der Schluß gezogen, daß es sich bei Fraktion I-GS-6 wahrscheinlich nicht um ein Fibrinogenabbauprodukt, sondern eher um eine eigene Verbindung handelt, in der die zwei  $\alpha$ - durch zwei weitere  $\beta$ -Ketten ersetzt sind.

G . L I T E R A T U R

- (1) Virchow, R.  
"Über den Faserstoff", in "Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medizin", Frankfurt a. M. (1856)
- (2) Denis, P.  
"Mémoire sur le sang", Baillière, Paris (1859)
- (3) Bang, N.U. und T.P. Ahny  
Federation Proc., 25 (1965) 386
- (4) Oncley, J.L., G. Scatchard und A. Brown  
J. Phys. and Colloid. Chem., 51 (1947) 184
- (5) Cohn, E.J., F.R.N. Gurd, D.M. Surgenor, B.A. Barnes, B.A. Brown,  
G. Derouaux, J.M. Gillespie, F.W. Kahnt, W.F. Lever, C.H. Liu,  
D. Mittelman, R.F. Mouton, K. Schmid und E. Uroma  
J. Am. Chem. Soc., 72 (1950) 465
- (6) Paar, D.  
Blut, 23 (1971) 1
- (7) Blombäck, B.  
Arkiv Kemi, 12 (1958) 99
- (8) Laki, K. und L. Mester  
Biochim. Biophys. Acta, 57 (1962) 152
- (9) Hörmann, H. und R. Gollwitzer  
Z. Physiol. Chem., 346 (1966) 21
- (10) Johnson, P. und E. Mihalyi  
Biochim. Biophys. Acta, 102 (1965) 467
- (11) Gollwitzer, R., R. Timpl, U. Becker und H. Furthmayr  
Eur. J. Biochem., 28 (1972) 497
- (12) Bailey, K., F.R. Bettelheim, L. Lorand und W.R. Middlebrook  
Nature, 167 (1951) 233

- (13) Blombäck, B. und R.F. Doolittle  
Acta chem. scand., 17 (1963) 1816
- (14) Bailey, K. und F.R. Bettelheim  
Biochim. Biophys. Acta, 18 (1955) 495
- (15) Blombäck, B., M. Blombäck, A. Henschen, B. Hessel, S. Iwanaga und  
K.R. Woods  
Nature, 218 (1968) 130
- (15a) Marder, V.J., A.Z. Budzynski und H.L. James  
J. Biol. Chem. 15 (1972) 4775
- (16) Henschen, A.  
Arkiv Kemi, 22 (1964) 375
- (17) Hall, C.E. und H.S. Slayter  
J. Biophys. Biochem. Cytol., 5 (1959) 11
- (18) Mihalyi, E.  
Biochim. Biophys. Acta, 102 (1965) 487
- (19) Huseby, R.M. und M. Murray  
Federation Proc. Abstracts, 26 (1967) 537
- (20) Bachmann, L. und Schmitt-Fumian  
Vortrag anlässlich des Fibrinogen-Symposiums des Sonderforschungsbe-  
reichs 51 in Martinsried am 15. 6. 73
- (21) Biggs, R. und R.G. MacFarlane  
"Human Blood Coagulation and its Disorders"  
Blackwell, Oxford (1962)
- (22) Straub, W. und F. Duckert  
Thromb. Diath. Haemorrhag., 5 (1961) 402
- (23) Bühlmann, A.A. und E.R. Froesch  
"Pathophysiologie", S. 117  
Springer, Berlin (1972)
- (24) Huseby, R.M. und N.U. Bang  
"Fibrinogen", in: Bang, N.U., F.K. Beller, E. Deutsch und E.F. Mammen  
"Thrombosis and Bleeding Disorders",  
G. Thieme, Stuttgart (1971)

- (25) Laki, K., J.A. Gladner und J.E. Folk  
Nature, 187 (1960) 758
- (26) Haschemeyer, A.E.V.  
Biochemistry, 2 (1963) 851
- (27) Bang, N.U.  
Thromb. Diath. Haemorrhag. Suppl. 13, 73 (1964) 131
- (28) Ferry, J.D. und S. Shulman  
J. Am. Chem. Soc., 71 (1949) 3198
- (29) Endres, G.F., S. Ehrenpreis und H.A. Sheraga  
Biochemistry, 5 (1966) 1561
- (30) Sheraga, H.A.  
Ann. N.Y. Acad. Sci., 75 (1958) 189
- (31) Lorand, L., D. Chenoweth und R.A. Domanik  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 37 (1969) 219
- (32) Wagner, H.  
Diplomarbeit, Universität München (1970)
- (33) Lorand, L., J. Downey, T. Gotoh, A. Jacobson und S. Tokura  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 31 (1968) 222
- (34) Chen, R. und R.F. Doolittle  
Proc. Nat. Acad. Sci., 66 (1970) 472
- (35) van de Loo, J. und R. Gross  
"Blutgerinnung und Fibrinolyse", S. 10  
Medizinische Universitätsklinik, Köln (1969)
- (36) Zollinger, H.U.  
"Pathologische Anatomie", Band I, S. 90  
G. Thieme, Stuttgart (1969),
- (37) Hamperl, H.  
"Lehrbuch der allgemeinen Pathologie und der pathologischen Anatomie",  
S. 177  
Springer, Berlin (1968)
- (38) Triantaphyllopoulos, D.C.  
Canad. J. Biochem., 36 (1958) 249

- (39) Bang, N.U.  
"Physiology and Biochemistry of Fibrinolysis", in: "Thrombosis and Bleeding Disorders", siehe (24)
- (40) Hammarsten, O.  
Pflügers Arch. Ges. Physiol., 19 (1879) 563
- (41) Astrup, T. und S. Darling  
Acta Physiol. Scand., 4 (1942) 45
- (42) Jaques, L.B.  
Biochem. J., 37 (1943) 344
- (43) Brown, M.E. und F. Rothstein  
Science., 155 (1967) 1017
- (44) Cohn, E.J., L.E. Strong, W.L. Hughes jr., D.E. Mulford, J.N. Ashworth, M. Melin und H.L. Taylor  
J. Am. Chem. Soc., 68 (1946) 459
- (45) Morrison, P.R., J.T. Edsall und S.G. Miller  
J. Am. Chem. Soc., 70 (1948) 3103
- (46) Keckwick, R.A., M.E. Mackay, M.H. Nance und B.R. Record  
Biochem. J., 60 (1955) 671
- (47) Kazal, L.A., S. Amsel, O.P. Miller und L.M. Tocantins  
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 113 (1963) 989
- (48) Straughn, W. und R.H. Wagner  
Thromb. Diath. Haemorrhag., 16 (1966) 198
- (49) Ware, A.G., M.M. Guest und W.H. Seegers  
Arch. Biochem., 13 (1947) 231
- (50) Mosesson, M.W.  
Biochim. Biophys. Acta, 57 (1962) 204
- (51) Finlayson, J.S. und M.W. Mosesson  
Biochemistry, 2 (1963) 42
- (52) Lewis, J.H.  
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 116 (1964) 120

- (53) Hörmann, H., J. van der Bosch und G. von Rosen  
"Electrophoresis and Chromatographie of Native and Sulphitolyzed Fibrinogen", in: Peeters, H., "Protides of the Biological Fluids", Proceedings of the 17 th Colloquium, Bruges 1969, S. 291 ff  
Pergamon Press, Oxford and New York (1970)
- (54) Blombäck, B. und M. Blombäck  
Arkiv Kemi, 10 (1956) 415
- (55) Krantz, S., M. Lober und H. Fiedler  
FEBS Lett., 2 (1970) 100
- (56) Takagi, T. und S. Iwanaga  
Biochim. Biophys. Acta, 194 (1969) 594
- (57) Brummel, M.C. und R. Montgomery  
Anal. Biochem., 33 (1970) 28
- (58) Gerbeck, C.M., T. Yoshikawa und R. Montgomery  
Arch. Biochem. Biophys., 134 (1969) 67
- (59) Gaffney, P.J.  
Nature, 230 (1971) 54
- (60) Mosesson, M.W. und S. Sherry  
Biochemistry, 5 (1966) 2829
- (61) Mosesson, M.W., N. Alkjaersig, B. Sweet und S. Sherry  
Biochemistry, 10 (1967) 3279
- (62) Sherman, L.A., M.W. Mosesson und S. Sherry  
Biochemistry, 8 (1969) 1515
- (63) Sherman, L.A., A.P. Fletcher und S. Sherry  
J. Lab. clin. Med., 73 (1969) 574
- (64) Hörmann, H. und C. Rodriguez-Fernandez  
Biochim. Biophys. Acta, 168 (1968) 157
- (65) Wuppermann, Th. und H. Hörmann  
Z. Physiol. Chem., 352 (1971) 1171
- (66) Wuppermann, Th., G. von Rosen und H. Hörmann  
Z. Physiol. Chem., 352 (1971) 1727

- (67) Witt, J. und H. Müller  
Biochim. Biophys. Acta, 221 (1970) 402
- (68) Morrison, P.R.  
J. Am. Chem. Soc., 69 (1947) 2723
- (69) Ellis, B.C. und A. Stransky  
J. Lab. clin. Med., 58 (1961) 477
- (70) Burmester, H.B.C., K. Aulton und G.J. Horsfield  
J. clin. Path., 23 (1970) 43
- (71) Schulz, F.H.  
Ärztl. Lab., 1 (1955) 107
- (72) Hübl, P.  
Ärztl. Lab., 5 (1959) 293
- (73) Hannig, K.  
Z. Physiol. Chem., 338 (1964) 211
- (74) van der Bosch, J.  
Diplomarbeit, Universität München (1969)
- (75) Henschen, A.  
Arkiv Kemi, 22 (1963) 1
- (76) Ornstein, L.  
Ann. N.Y. Acad. Sci., 121 (1964) 321
- (77) Maurer, H.R.  
"Disk-Elektrophorese, Theorie und Praxis der diskontinuierlichen  
Polyacrylamidgel-Elektrophorese",  
de Gruyter, Berlin (1968)
- (78) Clegg, J.B. und K. Bailey  
Biochim. Biophys. Acta, 63 (1962) 525
- (79) Henschen, A.  
Arkiv Kemi, 22 (1964) 355
- (80) Marbet, R. und A. Winterstein  
Acta physiol. helv., 11 (1953) 81
- (81) Walls, W.D. und M.S. Losowsky  
Rev. Europ. Etudes Clin. et Biol., 16 (1971) 44

- (82) Laki, K. und L. Lorand  
Science, 108 (1948) 280
- (83) Schachman, H.K.  
"Ultracentrifugation in Biochemistry", S. 222 ff.  
Academic Press, New York und London (1959)
- (84) Küster, F., A. Thiel und K. Fischbeck  
"Logarithmische Rechentafeln",  
de Gruyter, Berlin (1958)
- (85) Swan, J.M.  
Nature, 180 (1957) 643
- (86) Pechère, J.F., G.H. Dixon, R.H. Maybury und H. Neurath  
J. Biol. Chem., 233 (1958) 1364
- (87) Determann, H.  
"Gelchromatographie",  
Springer, Berlin (1967)
- (88) Katalog der Bio-Rad Laboratories GmbH, S. 44  
München (1968)
- (89) Mihalyi, E.  
"Review of the Physicochemistry of Bovin Fibrinogen with Special  
Reference to Its Proteolytic Fragmentation", in: Brinkhous, O.,  
"Fibrinogen: Structural, Metabolic and Pathophysiological Aspects",  
S. 43  
Schattauer, Stuttgart und New York (1970)
- (90) Marder, V.J., N.R. Shulman und W.R. Carroll  
J. Biol. Chem., 244 (1969) 2111
- (91) Sherry, S.  
"Current Status of Fibrinogen and Fibrin Degradation Products",  
in: "Fibrinogen" etc., siehe (89), S. 169 ff.
- (92) Fletcher, A.P., N. Alkjaersig, Sh. Fisher und S. Sherry  
J. Lab. clin. Med., 68 (1966) 780
- (93) Ganguly, P.  
J. Biol. Chem., 247 (1972) 1809

- (94) Pizzo, S.V., M.L. Schwartz, R.L. Hill und P.A. McKee  
J. Biol. Chem., 247 (1972) 636
- (95) Mills, D. und S. Karparkin  
Biochem. Biophys. Res. Comm., 40 (1970) 206
- (96) Mosesson, M.W., J.S. Finlayson, R.A. Umfleet und D. Galanakis  
J. Biol. Chem., 247 (1972) 5210
- (97) Gaffney, P.J. und P. Dobos  
FEBS Lett., 15 (1971) 13
- (98) Weinberg, R.W. und E. Mihalyi  
Fed. Proc., 30 (1971) 1076
- (99) Mills, D. und S. Karparkin  
Biochim. Biophys. Acta, 271 (1972) 163
- (100) Mills, D. und S. Karparkin  
Biochim. Biophys. Acta, 251 (1971) 121
- (101) Mills, D. und J.E. Liener  
Arch. Biochem. Biophys., 130 (1969) 621

## LEBENS LAUF

22. 3. 1947      Geburt in Neuburg a. d. Donau, als Sohn des Dr. Josef Jilg und seiner Ehefrau Gertrud, geb. Klär.
- 1953              Eintritt in die Volksschule Donaustauf bei Regensburg
- 1957              Eintritt in die erste Klasse des Neuen Gymnasiums Regensburg
- 1958 - 1959      Besuch der zweiten und dritten Klasse des Humanistischen Gymnasiums in Amberg/Oberpfalz
- 1960              Übersiedlung nach Bad Reichenhall und Übertritt in die vierte Klasse des humanistischen Zweiges des dortigen Karlsgymnasiums
- 1966              Ablegung der Reifeprüfung am humanistischen Zweig des Karlsgymnasiums Bad Reichenhall
- Beginn des Medizinstudiums an der Universität Würzburg
- 1967              Vorphysikum an der Universität Würzburg
- 1969              Physikum an der Universität Würzburg
- Immatrikulation am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München
- 1970 - 1972      Durchführung der Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung in München bei Priv. Doz. Dr. H. Hörmann
- 1973              Medizinisches Staatsexamen an der Technischen Universität München





